



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

«3» апреля 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора

для диагностики инфекционного перитонита кошек (ИПК) иммуноферментным методом
«ИПК-СЕРОТЕСТ»

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

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для диагностики инфекционного перитонита кошек (ИПК) иммуноферментным методом «ИПК-СЕРОТЕСТ»

2. Состав набора и внешний вид компонентов:

1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках антигеном коронавируса - 1 штука.

2). Положительный контроль (К+), жидкость от розового до красного цвета, 2,0 см³ - 1 флакон.

3). Отрицательный контроль (К-), жидкость от голубого до синего цвета, 2,0 см³ - 1 флакон.

4). 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с Твином 20 для промывки планшетов (ФСБТ), прозрачная бесцветная жидкость, 25 см³ - 2 флакона.

5). Сыворотка крови лошади, лиофилизированная (СЛ), порошок светло-желтого цвета, 1,0 см³ - 2 флакона.

6). Антитела к иммуноглобулину G кошки, меченные пероксидазой хрена (Конъюгат), 50-х концентрат, прозрачная жидкость зеленого цвета, 0,3 см³ - 1 флакон.

7). Хромоген-субстратный раствор (ТМБ), бесцветная прозрачная жидкость, 14,0 см³ - 1 флакон.

8). 1 М серная кислота (Стоп-раствор), бесцветная прозрачная жидкость, 5,1 см³ - 1 флакон.

3. Набор предназначен для выявления антител к коронавирусам кошек в сыворотке крови и определения их титра с целью диагностики инфекционного перитонита.

Набор рассчитан на скрининговый одновременный анализ 92 проб сыворотки крови или определения титра антител в 11 пробах. 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. Стеклоянные 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, знак соответствия, обозначение нормативного документа, надпись «для ветеринарного применения». 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.

Не использовать набор по истечении срока годности.

Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

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

6. Для проведения ИФА необходимы: одно- и многоканальные микропипетки переменных объемов со сменными наконечниками, мерная лабораторная посуда, дистиллированная или деионизованная вода, суховоздушный термостат с температурой 37°C, спектрофотометр с вертикальным лучом света длиной волны 450 нм.

***ВНИМАНИЕ!** Компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя при температуре от 2 до 8 °С. Не переливать в другую посуду! Не смешивать компоненты из наборов разных серий!*

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

7. Метод основан на взаимодействии иммобилизованного в лунках планшета антигена коронавируса со специфическими антителами из исследуемой пробы сыворотки и последующем выявлении полученного комплекса конъюгатом (мечеными пероксидазой хрена специфическими антителами к IgG кошки). Связанная пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антител в определяемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Подготовка к исследованию

8.1. Подготовка биологического материала

Для анализа используют сыворотку крови кошек. Образцы биоматериала можно хранить при температуре 4°C не более 3-х суток, при температуре минус 20°C – до 50-60 суток. Перед исследованием замороженные образцы нагреть в водяной бане при температуре 37°C в течение 5-10 мин.

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

Сильно гемолизированные и контаминированные сыворотки не пригодны для исследования.

Многократное замораживание и оттаивание образцов не допускается.

8.2. Подготовка рабочих растворов

8.2.1. Перед началом работы все реагенты выдержать не менее 0,5 ч при комнатной температуре (20° – 25°С) и тщательно перемешать.

8.2.2. *Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов (ФСБТ).* Содержимое флакона № 4 развести в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой (пример: для получения 500 мл рабочего раствора к 25 мл концентрата добавить 475 мл воды). Следует иметь в виду, что для обработки одного стрипа требуется примерно 30 мл рабочего раствора. Рабочий раствор стабилен при температуре 4°С в течение 3 сут. Для более длительного хранения раствор заморозить и хранить при минус 20° С.

8.2.3. *Буфер для разведения образцов и конъюгата (БР).* Представляет собой рабочий раствор ФСБТ, содержащий 5% сыворотки крови лошади.

БР готовят в 2 этапа:

1). Во флакон с СЛ (флакон №5) добавить 1 мл рабочего раствора ФСБТ (п. 8.2.2.) и тщательно перемешать содержимое до полного растворения.

2). Приготовить необходимое количество БР, разведя полученный раствор СЛ в 20 раз рабочим раствором ФСБТ (пример: для получения 10 мл БР необходимо к 9,5 мл рабочего раствора ФСБТ добавить 0,5 мл раствора СЛ).

ВНИМАНИЕ. Неиспользованный раствор СЛ хранить при минус 20° С.

8.2.4. *Рабочий раствор конъюгата.* Концентрат конъюгата (флакон № 6) развести в 50 раз буфером для разведения (БР, п. 8.2.3.) (пример: для получения 5 мл рабочего раствора конъюгата к 4,9 мл БР добавить 0,1 мл концентрата конъюгата и тщательно перемешать). Раствор готовят непосредственно перед применением.

8.2.5. Положительный контроль (К⁺, флакон № 2), отрицательный контроль (К⁻ флакон № 3), хромоген-субстратный раствор (ТМБ, флакон № 7) и стоп-раствор (флакон № 8) – готовы к применению.

9. Проведение анализа

9.1. *На первом этапе проводят скрининговые исследования проб сыворотки крови кошек, подозрительных на ИПК.*

9.1.1. Для этого каждую исследуемую сыворотку развести 1:200 в буфере для разведения образцов (БР, п. 8.2.3.) и внести в лунки планшета (каждую пробу можно вносить в 2-х повторях). Разведение проб проводят следующим образом:

а). В отдельных пробирках или в лунках круглодонного иммунологического планшета (в состав набора не входят) исследуемые сыворотки развести в 20 раз БР (пример: для получения 300 мкл пробы к 285 мкл БР добавить 15 мкл сыворотки, тщательно перемешать).

б). Конечное разведение 1:200 провести непосредственно в лунках планшета для ИФА (из набора). Для этого в лунки планшета внести по 90 мкл БР и добавить по 10 мкл разведенных в 20 раз сывороток. Тщательно перемешать.

В 4 лунки планшета внести по 100 мкл контрольных сывороток: 2 лунки для К⁺ и 2 лунки для К⁻.

Планшет заклеить липкой пленкой и инкубировать 1 ч в термостате при температуре 37°С.

9.1.2. Планшет 4 раза промыть рабочим буфером ФСБТ, приготовленным по п. 8.2.2., на автоматическом промывочном устройстве или вручную, доверху заполняя лунки (по 300 мкл/лунку), каждый раз полностью удаляя жидкость. Затем жидкость окончательно удалить и планшет подсушить, постукиванием по фильтровальной бумаге, сложенной в несколько слоев.

ВНИМАНИЕ. При этой процедуре возможно выпадение стрипов из рамки! Рекомендуется перед началом работы промаркировать стрипы для восстановления их первоначального расположения.

9.1.3. В каждую лунку внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, приготовленного по п.8.2.4. Планшет закрыть липкой пленкой и инкубировать 1 ч при температуре 37°C.

9.1.4. Повторить процедуру промывания (п. 9.1.2.).

9.1.5. В каждую лунку внести по 100 мкл хромоген-субстратного раствора (ТМБ). Планшет инкубировать 15 мин в темноте при комнатной температуре (20°-25°C).

Реакцию остановить добавлением в каждую лунку по 50 мкл стоп-раствора (1М H₂SO₄).

9.1.6. После остановки реакции оптическую плотность субстратной смеси измерить на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм (A₄₅₀).

9.2. Учет и интерпретация результатов первичного анализа

Вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности для проб положительного контроля (A₄₅₀ K⁺) и отрицательного контроля (A₄₅₀ K⁻).

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

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

$$A_{450} K^- < 0,25$$

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют. Если A₄₅₀ K⁺ и A₄₅₀ K⁻ соответствуют вышеуказанным критериям, проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

Вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности для каждой опытной пробы (A₄₅₀ ОП) (если пробы исследовали в двух повторах).

Вычислить отсекающее значение A₄₅₀ (Cut off), необходимое для правильной интерпретации результатов:

$$\text{Cut off} = A_{450} K^- \times 2,5$$

Если при первичном анализе сывороток (в разведении 1:200) величина оптической плотности A₄₅₀ОП ≥ Cut off пробу считают положительной на наличие антител к коронавирусам кошек.

Если величина A₄₅₀ОП < Cut off пробу считают отрицательной.

9.3. Определение величины титра антител в сыворотках.

9.3.1. В случае выявления положительных к коронавирусам проб при первичном анализе, их необходимо раститровать, делая последовательные разведения непосредственно в лунках планшета для ИФА. Для этого в верхний ряд планшета (по количеству титруемых проб) внести по 200 мкл сывороток в разведении 1:200. Во все последующие лунки внести по 100 мкл БР и провести последовательные разведения сывороток с шагом 2. В результате получим разведения сывороток с 1:200 до 1: 25600. В 4 лунки планшета внести по 100 мкл контрольных сывороток: 2 лунки для K⁺ и 2 лунки для K⁻.

Планшет закрыть липкой лентой и инкубировать 1 ч при температуре 37°C.

Далее реакцию проводить согласно п. 9.1.2 - 9.1.6.

9.4. Интерпретация результатов титрования сывороток

Титром антител следует считать последнее разведение сыворотки, при котором величина A₄₅₀ ОП ≥ Cut off (формула для вычисления в п. 9.2.).

Титр антител 1:200 – 1:400 следует считать фоновым и интерпретировать как отрицательный диагноз на ИПК.

Титр антител от 1:800 до 1:1600 свидетельствует о возможной инфицированности животного как вирусом ИПК, так и другими коронавирусами кошек (энтеральным или

ксеногенными коронавирусами), а также может указывать на латентную форму болезни или носительство.

Животных со значениями титров 1:800 – 1:1600 необходимо исследовать повторно через 2 – 4 недели. Нарастание титра антител за этот период свидетельствует о развитии инфекционного процесса, характерного для ИПК.

Диагностическим титром ИПК следует считать титр антител 1:3200 и выше.

Если при повторном исследовании первоначальный титр сохраняется или снижается - диагноз на ИПК считать отрицательным.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

10. Работу с компонентами набора следует проводить с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и техники безопасности при работе с биологическим материалом и химическими веществами. В случае попадания их на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим». Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.16.