



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

2017.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора

для выявления антигенов парвовируса собак, вирусов энтерита норок и панлейкопении кошек иммуноферментным анализом (ИФА)
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антигенов парвовируса собак, вирусов энтерита норок и панлейкопении кошек иммуноферментным анализом (ИФА).

2. **Состав набора.** Набор состоит из 11 компонентов.

Специфические компоненты

- 1). Специфический иммуноглобулин G (IgG) к ВЭС, лиофилизированная гомогенная аморфная масса белого с сероватым оттенком или светло-желтого цвета – 1 флакон, 0,2 см³.
- 2). Положительный контроль (К+) - специфический антиген ВЭС, лиофилизированная гомогенная масса светло-желтого цвета с розовым оттенком - 1 флакон, 1,0 см³.
- 3). Отрицательный контроль (К-) - лизат клеток без вируса, лиофилизированная гомогенная масса светло-желтого цвета с розовым оттенком - 1 флакон, 1,0 см³.
- 4). Конъюгат – специфический иммуноглобулин G к ВЭС, меченый пероксидазой хрена, лиофилизированная гомогенная масса светло-желтого цвета - 1 флакон, 0,2 см³.

Неспецифические компоненты

- 5). Карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ), прозрачная бесцветная жидкость - 1 флакон, 11,0 см³.
- 6). 20-кратный концентрат фосфатно-солевого, содержащего твин 20, буферного раствора (ФСБТ), рН 7,2-7,4, прозрачная бесцветная жидкость - 2 флакона по 25,0 см³.
- 7). Буферный раствор для разведения реагентов (БДР), прозрачная жидкость красного цвета – 2 флакона по 20,0 см³.
- 8). Хромоген-субстратный раствор (ТМБ), прозрачная бесцветная жидкость - 1 флакон, 14,0 см³.
- 9). 1 М серная кислота (стоп-раствор), прозрачная бесцветная жидкость - 1 флакон, 5,1 см³.
- 10). Плоскодонный полистироловый планшет 96-луночный - 1 штука.

3. Набор предназначен для выявления специфического антигена парвовируса собак (ВЭС), вирусов энтерита норок и панлейкопении кошек в биологическом материале от больных, подозрительных на заболевание и экспериментально зараженных животных иммуноферментным анализом (ИФА). Набор рассчитан на проведение 45 анализов (в двух 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 полиэтиленовые пакеты.

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!** Флаконы без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета подлежат выбраковке. Микропанели и контрольные антигены обеззараживают 3% раствором хлорамина. Остальные компоненты набора не требуют специальных мер утилизации.

Не использовать наборы по окончании срока годности.

Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Примечание: Набор содержит все необходимые для анализа компоненты. Дополнительно требуются микротипетки на 10, 100, 200 и 1000 мкл, мерная лабораторная посуда, дистиллированная вода, суховоздушный термостат с температурой 37°C, спектрофотометр для иммуноферментного анализа со светофильтром на 450 нм.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

6. Метод основан на взаимодействии иммобилизованного на поверхности лунок планшета специфического иммуноглобулина (IgG) с антигеном ВЭС из исследуемой пробы и последующем выявлении полученного комплекса конъюгатом (меченым пероксидазой хрена специфическим иммуноглобулином G к антигену ВЭС). Связанная пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антигена в определяемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

7. Подготовка материала для анализа и рабочих растворов

7.1. Подготовка биологического материала

Для анализа используют пробы фекалий, дефибринированную кровь от живых животных, а также участки тонкого и толстого отделов кишечника, взятые от павших или вынужденно убитых животных в первые часы после гибели. Из материала готовят 10%-ную суспензию на забуференном физрастворе (в набор не входит) и центрифугируют ее 10 мин при 2000-3000 об/мин. Анализируют полученный супернатант.

Предназначенный для исследования биоматериал можно хранить в морозильной камере бытового холодильника. Размораживать только перед анализом!

Если животные были вакцинированы, исследования проводят не ранее, чем через 10 дней после вакцинации.

7.2. Подготовка рабочих растворов

7.2.1. Перед началом работы все компоненты выдерживают не менее 0,5 ч при комнатной температуре.

7.2.2. Буфер для растворения специфического иммуноглобулина G – карбонатно-бикарбонатный буфер (флакон 5 - КББ) готов к применению.

7.2.3. **Рабочий раствор для промывания планшетов (ФСБТ).** К 25 мл концентрата ФСБТ (флакон 6) добавляют 475 мл дистиллированной воды. Готовый раствор стабилен 3 сут.

при 4°C. Для более длительного хранения неиспользованный раствор замораживают и хранят при минус 20°C.

7.2.4. Раствор для блокировки свободной поверхности лунок, для растворения положительного (К+), отрицательного (К-) контролей и конъюгата (флакон 7, БДР) - готов к применению.

7.2.5 **Раствор специфического иммуноглобулина для сенсibilизации планшета.** Содержимое флакона 1 растворяют в 11 мл КББ. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

7.2.6. **Раствор положительного контроля (К+).** Содержимое флакона 2 (специфический антиген) растворяют в 2 мл БДР (флакон 7). Раствор готовят непосредственно перед использованием. Неиспользованный раствор фасуют в пробирки типа «Эппендорф» по 0,25 мл и хранят при температуре минус 20°C и ниже до следующего исследования, избегая повторного замораживания.

7.2.7. **Раствор отрицательного контроля (К-).** Содержимое флакона 3 (лизат клеток без вируса) растворяют в 2 мл БДР (флакон 7). Раствор готовят непосредственно перед использованием. Неиспользованный раствор фасуют в пробирки типа «Эппендорф» по 0,25 мл и хранят при температуре минус 20°C и ниже до следующего исследования, избегая повторного замораживания.

7.2.8. **Раствор конъюгата.** Содержимое флакона 4 (конъюгат) растворяют в 0,1 мл БДР (флакон 7) и доводят объем до 10 мл этим же буфером. Раствор готовят непосредственно перед использованием. Неиспользованный раствор фасуют в пробирки типа «Эппендорф» по 0,8 мл и хранят при температуре минус 20°C и ниже до следующего исследования, избегая повторного замораживания.

7.2.9. Хромоген-субстратный раствор (ТМБ, флакон 8), раствор для остановки реакции (**Стоп-раствор**, флакон 9) - готовы к применению.

8. Постановка реакции

8.1. Во все лунки планшета вносят по **100 мкл раствора специфического иммуноглобулина G** (см. п.7.2.5).

8.2. Планшет закрывают липкой пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют 3-4 ч при 37°C или 18 ч при 4°C.

8.3. Планшет промывают **4 раза** рабочим раствором **ФСБТ** (см. п.7.2.3) на автоматическом промывочном устройстве или вручную, доверху заполняя лунки (300 мкл/лунку). Затем жидкость из лунок полностью удаляют постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

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

8.4. Во все лунки планшета вносят по **200 мкл БДР** (см. п.7.2.4). Планшет заклеивают липкой пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют 0,5 ч при 37°C.

***ВНИМАНИЕ.** Если количество образцов для исследования не позволяет использовать планшет полностью, то не использованные стрипы замораживают с раствором **БДР**. Стрипы помещают в полиэтиленовый пакет и хранят до момента использования при температуре от минус 20 до минус 40°C, не допуская повторного замораживания. По мере необходимости стрипы размораживают и используют в реакции, начиная с п. 8.5.*

8.5. Планшет 2 раза промывают рабочим раствором ФСБТ по п. 8.3..

8.6. В лунки **A1-B1** вносят по **100 мкл БДР** - контроль конъюгата.

8.7. В лунки **C1-D1** вносят по **100 мкл раствора отрицательного контроля (К-)** (см. п.7.2.7).

8.8. В лунки **E1-F1** вносят по **100 мкл раствора положительного контроля (К+)** (см. п.7.2.6).

8.9. В остальные лунки планшета вносят по **100 мкл исследуемых образцов** (см. п.7.1) (по 2 лунки на каждый образец).

8.10. Планшет заклеивают липкой пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и

инкубируют 1 ч при 37°C.

8.11. Планшет **4 раза** промывают буфером **ФСБТ** (см. п.8.3).

8.12. Во все лунки планшета вносят по **100 мкл конъюгата** (см. п.7.2.8).

8.13. Планшет помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют 1 ч при 37°C.

8.14. Планшет **4 раза** промывают буфером **ФСБТ** по п.8.3.

8.15. Во все лунки планшета вносят по 100 мкл хромоген-субстратного раствора (ТМБ).

8.16. Планшет инкубируют 20 мин при комнатной температуре в темном месте.

8.17. Реакцию останавливают добавлением во все лунки планшета по **50 мкл стоп-раствора**.

9. Оценка и интерпретация результатов реакции

9.1. Визуальный учет

Лунки с положительным контролем должны иметь сине-голубое окрашивание до остановки реакции (желтое - после остановки реакции).

Лунки с отрицательным контролем и контролем конъюгата должны оставаться бесцветными (до и после остановки реакции).

Лунки с исследуемыми образцами, в которых присутствует специфический антиген, имеют сине-голубое (желтое - после остановки реакции) окрашивание различной интенсивности в зависимости от концентрации антигена.

Реакцию считают положительной, когда заметна четкая разница в интенсивности окрашивания опытных и контрольных отрицательных (К-) лунок планшета.

9.2. Инструментальный учет

Результаты ИФА учитывают после остановки реакции стоп-раствором на спектрофотометре (Ридер) при длине волны **450 нм**.

Величина оптической плотности для положительного контроля (К+) должна быть **не ниже 0,4**, а отношение средней величины оптической плотности К+ к средней величине оптической плотности К- должно быть **не менее 3,0**.

Реакцию считают **положительной** если соотношении величины оптической плотности в лунке с **исследуемой пробой (Р)** к величине оптической плотности в лунке с **отрицательным контролем (N)** не менее **2,1** ($P/N \geq 2,1$).

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