



УТВЕРЖДАЮ  
Генеральный директор  
ООО «Ветбиохим»  
А.В. Кривонос  
«3» апреля 2017 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антигенов аденовирусов плотоядных  
иммуноферментным анализом (ИФА)  
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

### I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антигенов аденовирусов плотоядных иммуноферментным анализом (ИФА).

2. Состав набора и внешний вид компонентов:

#### Специфические компоненты

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

#### Неспецифические компоненты

5. Карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ), бесцветная прозрачная жидкость - 1 флакон, 11 см<sup>3</sup>.
6. 20-кратный концентрат фосфатно-солевого, содержащего твин 20, буферного раствора (ФСБТ), бесцветная прозрачная жидкость - 2 флакона по 25 см<sup>3</sup>.
7. Буферный раствор для разведения реагентов (БДР), прозрачная жидкость красного цвета – 2 флакона по 20 см<sup>3</sup>.
8. Хромоген-субстратный раствор (ТМБ) - бесцветная прозрачная жидкость - 1 флакон, 14 см<sup>3</sup>.
9. 1 М серная кислота (стоп-раствор), бесцветная прозрачная жидкость - 1 флакон, 5,1 см<sup>3</sup>.
10. Плоскодонный полистироловый планшет 96-луночный -1 шт.
11. Инструкция по применению – 1 экз.

3. Набор предназначен для выявления специфических антигенов аденовирусов плотоядных (CAV, типов 1 и 2) в биологическом материале от больных и экспериментально зараженных животных иммуноферментным анализом (ИФА).

4. Компоненты набора расфасовывают в пластиковые (стеклянные), герметично закупоренные 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 товарного знака организации-производителя, 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 товарный знак организации-производителя, 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.

*Примечание: Набор содержит все необходимые для анализа компоненты. Дополнительно требуются микропипетки на 100, 200 и 1000 мкл и наконечники к ним, мерная лабораторная посуда, дистиллированная вода, суховоздушный термостат с температурой 37°C, спектрофотометр с длиной волны 450 нм.*

5. 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.

6. 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. Запрещено использовать наборы по окончании срока годности. Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

## **II. ПРИНЦИП МЕТОДА**

7. Метод основан на взаимодействии иммобилизованного на поверхности лунок планшета специфического иммуноглобулина с аденовирусными антигенами из исследуемых образцов и последующем выявлении полученных комплексов конъюгатом (меченым пероксидазой хрена специфическим иммуноглобулином G к аденовирусному антигену). 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**

### **8. Подготовка материала для анализа и рабочих растворов**

#### **8.1. Подготовка биологического материала**

Для анализа используют: пробы фекалий, мочу, носовые и фарингеальные смывы, дефибринированную кровь, взятые от живых животных и фрагменты печени, взятые в первые часы после гибели животных. Из фекалий и кусочков печени готовят 10%-ную суспензию на забуференном физрастворе (рН 7,2-7,4; в набор не входит) или на БДР и центрифугируют 10 мин. при 2000-3000 об/мин. Анализируют полученный супернатант.

Смывы перед анализом не обрабатывают. Мочу разводят 1:1 забуференным физраствором или БДР.

Предназначенный для исследования материал можно хранить в морозильной камере бытового холодильника не более 2-х недель. Размораживать только перед анализом! Повторное замораживание не допускается.

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

#### **8.2. Подготовка рабочих растворов**

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

8.2.2. Буфер для растворения специфического иммуноглобулина G – карбонатно-



бикарбонатный буфер (флакон 5 - КББ) готов к применению.

8.2.3. **Рабочий раствор для промывки планшетов (ФСБТ).** Содержимое флаконов 6 растворяют в 1000 мл дистиллированной воды. Готовый раствор стабилен 3 сут. при 4°C. Для более длительного хранения неиспользованный раствор замораживают и хранят при минус 20°C.

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

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

8.2.6. Раствор **положительного контроля (К+).** Содержимое флакона 2 растворяют в 2 мл БДР (флакон 7). Раствор готовят непосредственно перед применением. 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.

8.2.7. Раствор **отрицательного контроля (К-).** Содержимое флакона 3 растворяют в 2 мл БДР (флакон 7). Раствор готовят непосредственно перед применением. 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.

8.2.8. **Раствор конъюгата.** Содержимое флакона 4 растворяют в 0,1 мл БДР (флакон 7) и доводят объем до 10 мл этим же буфером. Раствор готовят непосредственно перед применением. Неиспользованный раствор фасуют в пробирки типа «Эппендорф» по 0,9 мл и хранят при температуре минус 20°C и ниже до следующего исследования, избегая повторного замораживания.

8.2.9. Хромоген-субстратный раствор (ТМБ, флакон 8) и **Стоп-раствор**, (флакон 9) готовы к применению

## 9. Постановка реакции

9.1. Во все лунки планшета вносят по 100 мкл раствора специфического иммуноглобулина G (см. п.8.2.5).

9.2. Планшет помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют 3-4 час при 37°C или 18 час при 4°C.

9.3. Планшет промывают 4 раза буфером ФСБТ (300 мкл/лунка) (см. п.8.2.3), каждый раз полностью удаляя жидкость из лунок постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

9.4. Во все лунки планшета вносят по 150 мкл БДР. Планшет помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют 0,5 час при 37°C.

*ВНИМАНИЕ. Если количество образцов для исследования не позволяет использовать планшет полностью, то неиспользованные стрипы замораживают с раствором БДР. Стрипы помещают в полиэтиленовый пакет и хранят до момента использования при температуре от минус 20<sup>0</sup> до минус 40<sup>0</sup> С, не допуская повторного замораживания. По мере необходимости стрипы размораживают, промывают раствором ФСБТ и используют в реакции, начиная с п. 9.6*

9.5. Планшет 2 раза промывают буфером ФСБТ (см. п.9.3).

9.6. В лунки А1-В1 вносят по 100 мкл БДР - контроль конъюгата.

9.7. В лунки С1-Д1 вносят по 100 мкл раствора отрицательного контроля (К-) (см. п.8.2.7).

9.8. В лунки Е1-Ф1 вносят по 100 мкл раствора положительного контроля (К+) (см. п.8.2.6).

9.9. В остальные лунки вносят по 100 мкл исследуемых образцов (см. п.8.1) (по 2 лунки на каждый образец).

9.10. Планшет помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют 1 час при 37°C.

9.11. Планшет 4 раза промывают буфером ФСБТ (см. п. 9.3).



- 9.12. Во все лунки планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата (см. п.8.2.8).  
9.13. Планшет помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют 1 час при 37°C.  
9.14. Планшет 4 раза промывают буфером ФСБТ (см. п.9.3).  
9.15. Во все лунки планшета вносят по 100 мкл хромоген-субстратного раствора (ТМБ).  
9.16. Планшет инкубируют 20 мин при комнатной температуре в темном месте.  
9.17. Реакцию останавливают добавлением во все лунки планшета по 50 мкл стоп-раствора.

## 10. Оценка и интерпретация результатов

### 10.1 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 (допускается бледно-голубое окрашивание до остановки и светло желтое - после остановки реакции)

Лунки с исследуемыми образцами, в которых присутствуют специфический антиген, должны иметь 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.

### 10.2. Инструментальный учет (после остановки реакции)

Учет результатов проводят на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм, измеряя оптическую плотность (ОП) каждой лунки.

Вычисляют среднее значение оптической плотности для проб положительного контроля (ОП<sub>ср</sub> К<sup>+</sup>), для проб отрицательного контроля (ОП<sub>ср</sub> К<sup>-</sup>) и исследуемых проб (ОП<sub>ср</sub> Р).

**Показатель ОП<sub>ср</sub> К<sup>+</sup> должен быть не ниже 0,4, а (ОП<sub>ср</sub> К<sup>+</sup>) / (ОП<sub>ср</sub> К<sup>-</sup>) ≥ 3,0.**

Реакцию считают положительной, если отношение средней величины оптической плотности в лунках с исследуемой пробой (ОП<sub>ср</sub> Р) к средней величине оптической плотности в лунках с отрицательным контролем (ОП<sub>ср</sub> К<sup>-</sup>) не менее 2,1, т.е.  $(\text{ОП}_{\text{ср}} \text{ Р}) / (\text{ОП}_{\text{ср}} \text{ К}^-) \geq 2,1$ .

## IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

11. 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