



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

«3» апреля 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антигена вируса чумы собак
иммуноферментным анализом (ИФА)
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антигена вируса чумы собак иммуноферментным анализом (ИФА)

2. Состав набора

Специфические компоненты

- 1). Специфический иммуноглобулин G (IgG) к ВЧС, лиофилизированная гомогенная аморфная масса белого с сероватым оттенком или светло-желтого цвета – 1 флакон, 0,2 см³.
- 2). Положительный контроль (К+) - специфический антиген ВЧС, 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 ВЧС, 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 буферного раствора, содержащего твин 20 (ФСБТ), 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 вируса чумы собак (ВЧС) в биологическом материале от больных, подозреваемых в заболевании и экспериментально зараженных животных (собак, лисиц, норок, песцов, соболей и др.) 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. Стеклообразные 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.

Набор следует хранить в местах, недоступных для детей

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.

Примечание: Набор содержит все необходимые для анализа компоненты. Дополнительно требуются микропипетки 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 с антигеном ВЧС из исследуемой пробы и последующем выявлении полученного комплекса конъюгатом (меченым пероксидазой хрена специфическим иммуноглобулином G к антигену ВЧС). 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 дефибрированную кровь или участки головного мозга (от павших и вынужденно убитых животных). Конъюнктивальные и назальные смывы перед анализом не обрабатывают. Из кусочков органов готовят 10%-ную суспензию на забуференном физрастворе (в набор не входит) и центрифугируют 10 мин при 2000-3000 об./мин. Анализируют полученный супернатант.

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

Если животные были вакцинированы против чумы, 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 промывки планшетов (ФСБТ)**. К 25 мл концентрата (флакон б) 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. **Хромоген-субстратный раствор** (ТМБ, флакон 8) – готов к применению.

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

7.2.7. **Раствор положительного контроля (К+)**. Содержимое флакона 2 (специфический антиген ВЧС) 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.

7.2.8. **Раствор отрицательного контроля (К-)**. Содержимое флакона 3 (лизат клеток без ВЧС) - 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.

7.2.9. **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 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.

7.2.10. Раствор для остановки реакции (**Стоп-раствор**, флакон 9) - готов к применению.

8. Проведение анализа

8.1 Во все лунки планшета вносят по **100 мкл раствора специфического иммуноглобулина G** (см. п.7.2.6).

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** 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**. Планшет закрывают липкой пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют 30 мин 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 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** (см. 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.7.2.8).

8.8. В лунки **E1-F1** вносят по **100 мкл раствора положительного контроля (К+)** (см. п.7.2.7).

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

8.10. Планшет закрывают липкой пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют 1 ч при 37°C.

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

8.12. Во все лунки планшета вносят по **100 мкл конъюгата** (см. п.7.2.9).

8.13. Планшет закрывают липкой пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют 1 ч при 37°C.

8.14. Планшет 4 раза промывают рабочим раствором **ФСБТ** (см. 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 сразу после остановки реакции на спектрофотометре при длине волны **450 нм**.

Вычисляют средние значения оптической плотности для проб положительного контроля (ОП_{ср} К⁺), для проб отрицательного контроля (ОП_{ср} К⁻) и испытуемых проб (ОП_{ср} Р).

Показатель ОП_{ср} К⁺ должен быть выше 0,4, а (ОП_{ср} К⁺) / (ОП_{ср} К⁻) ≥ 3,0.

Реакцию считают **положительной** если отношение средней величины оптической плотности в лунках с исследуемой пробой (ОП_{ср} Р) к средней величине оптической плотности в лунках с отрицательным контролем (ОП_{ср} К⁻) не менее 2,1, т.е. **(ОП_{ср} Р) / (ОП_{ср} К⁻) ≥ 2,1.**

Если **(ОП_{ср} Р) / (ОП_{ср} К⁻) < 2,1**, реакцию считают **отрицательной**.

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