



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

«3» апреля 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления
антител к вирусу гриппа А иммуноферментным методом
«ГРИПП А-СЕРОТЕСТ»
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к вирусу гриппа А (ВГА) иммуноферментным методом «ГРИПП А - СЕРОТЕСТ»

2. В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках очищенным рекомбинантным нуклеокапсидным белком (НР) ВГА – 2 штуки.

2). Положительный контроль (**К+**) – положительная сыворотка крови птиц или животных, содержащая антитела к ВГА, прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость от розового до красного цвета, 1,0 см³ – 1 флакон.

3). Отрицательный контроль (**К-**) – отрицательная сыворотка крови птиц или животных, не содержащая антитела к ВГА, прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость от голубого до синего цвета, 1,0 см³ – 1 флакон.

4). 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с Твином 20 для промывания планшетов (**ФСБТ**), бесцветная или с желтоватым оттенком прозрачная жидкость, 25,0 см³ – 2 флакона.

5). Буфер для разведения образцов (**БР**), прозрачная жидкость от розового до красного цвета, 20,0 см³ – 3 флакона.

6). **Конъюгат** - антитела к НР ВГА, меченные пероксидазой хрена, 20-х концентрат, прозрачная жидкость зеленого цвета, 1,0 см³ – 1 флакон.

7). Хромоген-субстратный раствор (ТМБ), бесцветная прозрачная жидкость, 14,0 см³ – 2 флакона.

8). 1 М Серная кислота (**Стоп-раствор**), бесцветная прозрачная жидкость, 10,0 см³ – 1 флакон.

3. Набор предназначен для выявления антител к ВГА в сыворотке крови животных и птиц иммуноферментным методом (ИФА).

Набор рассчитан на одновременное исследование на одном планшете 46 проб сыворотки крови и двух контрольных проб (в 2-х повторях). Компонировка 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, 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 (за исключением сывороток)! Запрещается смешивать компоненты наборов разных серий, переливать в другую посуду и 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 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 конкурентном взаимодействии конъюгированных с пероксидазой моноклональных антител к NP ВГА (конъюгат) и сывороточных вирусспецифических антител с рекомбинантным NP ВГА, иммобилизованным в лунках иммунологического планшета.

При отсутствии в исследуемой сыворотке вирусспецифических антител, конъюгат свободно взаимодействует с иммобилизованным в лунках антигеном ВГА и, после добавления хромоген – субстратного раствора, содержимое лунки окрашивается.

Если в исследуемой сыворотке содержатся вирусспецифические антитела, происходит их взаимодействие с иммобилизованным NP ВГА и его частичная или полная блокировка. В результате чего связывание конъюгата с антигеном и, соответственно, интенсивность окраски снижаются или отсутствуют (т.е. интенсивность окраски содержимого в лунке обратно пропорциональна количеству антител в исследуемой сыворотке).

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Подготовка к исследованиям

8.1. Подготовка проб сыворотки крови

Для исследования в лабораторию доставляют индивидуальные пробы сыворотки крови животных или птиц без признаков гемолиза и бактериальной контаминации. Объем пробы должен быть 0,3-0,5 мл. Образцы биологического материала можно хранить при температуре 4°C не более 3-х сут. Для более длительного хранения образцы замораживают при минус 20°C. Перед исследованием замороженные образцы быстро (в течение 5-10 мин) нагревают в водяной бане при температуре 37°C.

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

Многократное (более 2-х раз) замораживание и оттаивание образцов сыворотки крови не допускается.

8.2 Подготовка рабочих растворов

8.2.1. Перед началом работы все компоненты набора выдерживают не менее 30 мин при комнатной температуре (20-25°C) и тщательно перемешивают. Оставшиеся после частичного использования компоненты должны храниться плотно закрытыми, в упаковке производителя.

8.2.2. Рабочий раствор для промывания планшетов (ФСБТ). Содержимое флакона № 4 разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной или деионизованной водой и тщательно перемешивают. (Пример: для получения 500 мл рабочего раствора к 25 мл концентрата добавляют 475 мл воды). Рабочий раствор ФСБТ стабилен при температуре 4°C в течение 3 сут.

8.2.3. Рабочий раствор коньюгата. Коньюгат (флакон № 6) разводят в 20 раз буфером для разведения (БР, флакон № 5). (Пример: для получения 10 мл рабочего раствора к 9,5 мл БР добавить 0,5 мл коньюгата и тщательно перемешать). Раствор коньюгата готовят непосредственно перед использованием.

8.2.4. Остальные компоненты набора: положительный контроль (флакон № 2), отрицательный контроль (флакон № 3), буфер для разведения образцов (флакон № 5), хромоген-субстратный раствор (ТМБ, флакон № 7) и стоп-раствор (флакон № 8) - готовы к применению.

9. Проведение иммуноферментного анализа

9.1. Исследуемые сыворотки крови животных и птиц разводят в 10 раз буфером для разведения образцов (БР). Для этого к 270 мкл БР добавляют 30 мкл сыворотки крови и трижды пипетируют. Для каждой пробы используют новый наконечник.

9.2. Планшет извлекают из пакета и в его лунки вносят иммуноспецифические компоненты и испытуемые сыворотки:

- лунки А1-А2 по 100 мкл отрицательного контроля;
- лунки В1-В2 по 100 мкл положительного контроля;
- в остальные лунки вносят по 100 мкл подготовленных по п.9.1. исследуемых проб сыворотки крови (по две лунки на каждую пробу).

Планшет заклеивают липкой пленкой и инкубируют 1 ч при температуре 37°C.

9.3. Планшет 5 раз промывают рабочим раствором ФСБТ, подготовленным по п. 8.2.2., на автоматическом промывочном устройстве или вручную, доверху заполняя лунки (300 мкл на лунку), каждый раз полностью удаляя жидкость постукиванием перевернутого планшета по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

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

9.4. В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл рабочего раствора коньюгата, подготовленного по п. 8.2.3. Планшет заклеивают липкой пленкой и инкубируют 1 ч при температуре 37°C.

9.5. Планшет 5 раз промывают рабочим раствором ФСБТ (см. п.9.3.).

9.6. В каждую лунку вносят по 100 мкл хромоген-субстратного раствора (ТМБ), накрывают крышкой и инкубируют 15 мин в темноте при комнатной температуре (20-25⁰С).

9.7. Реакцию останавливают, добавляя в каждую лунку по 50 мкл стоп-раствора, и проводят учет результатов.

9.8. Реакцию учитывают путем измерения оптической плотности (ОП) в каждой лунке на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм (A_{450}).

10. Учет и интерпретация результатов реакции

10.1. Вычисляют среднее арифметическое значение ОП для проб отрицательного ($A_{450} K_{cp}^-$) и положительного ($A_{450} K_{cp}^+$) контролей.

Результаты реакции считаются достоверными и могут быть учтены, если разница (Δ) средних значений ОП отрицательного и положительного контролей не менее 0,4, т.е. $\Delta = (A_{450} K_{cp}^-) - (A_{450} K_{cp}^+) \geq 0,4$.

Если полученные данные выходят за пределы этого значения, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют. При повторном получении недостоверных результатов набор подлежит выбраковке.

10.2. Далее вычисляют среднее арифметическое значение ОП для каждой пробы испытуемой сыворотки ($A_{450} ОП_{cp}$).

10.3. Вычисляют $K_{инг}$ – коэффициент ингибирования связывания конъюгата сывороточными антителами по формуле:

$$K_{инг} = \frac{(A_{450} K_{cp}^-) - (A_{450} ОП_{cp})}{(A_{450} K_{cp}^-) - (A_{450} K_{cp}^+)} \times 100$$

Пробы сыворотки крови со значением $K_{инг}$ меньше 45% считают отрицательными.

Пробы сыворотки крови со значением $K_{инг}$ больше 50% считают положительными.

Если значение $K_{инг}$ 45 - 50%, пробы считают сомнительными и исследуют повторно.

VI. 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.