



УТВЕРЖДАЮ  
Генеральный директор  
ООО «Ветбиохим»  
А.В. Кривонос

03 ФЕВ 2022

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора

для выявления антител к вирусу диареи крупного рогатого скота (ВДКРС)

иммуноферментным методом

«ВДКРС-СЕРОТЕСТ плюс»

(Организация - производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

### I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к вирусу диареи крупного рогатого скота (ВДКРС) иммуноферментным методом «ВДКРС-СЕРОТЕСТ плюс».

2. Состав набора и внешний вид компонентов:

- 1) Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках специфическим антигеном вируса диареи крупного рогатого скота – 2 штуки;
- 2) Положительный контроль для сыворотки крови ( $K^+$  сыв), содержит антитела к ВДКРС, жидкость от желтого цвета до светло-коричневого 0,35 мл – 1 пробирка;
- 3) Отрицательный контроль для сыворотки крови ( $K^-$  сыв), не содержит антител к ВДКРС, жидкость от желтого цвета до светло-коричневого 0,35 мл – 1 пробирка;
- 4) Положительный контроль для молока ( $K^+$  мол), содержит антитела к ВДКРС, жидкость от оранжевого до красного цвета, 1,8 мл – 1 пробирка;
- 5) Отрицательный контроль для молока ( $K^-$  мол), не содержит антител к ВДКРС, жидкость от голубого до синего цвета, 1,8 мл – 1 пробирка;
- 6) Конъюгат для исследования сыворотки крови – моноклональные антитела к белку р 80/ 125 ВДКРС – 100-кратный концентрат, бесцветная прозрачная жидкость, 0,2 мл – 1 пробирка;
- 7). Конъюгат для исследования молока – моноклональные антитела к IgG КРС, бесцветная прозрачная жидкость, 100-кратный концентрат, 0,25 мл – 1 пробирка;
- 8) Промывочный буфер (ФСБТ), 20-кратный концентрат, бесцветная прозрачная жидкость, 25 мл – 4 флакона;
- 9) Субстратный раствор (ТМБ), бесцветная прозрачная жидкость, 30 мл – 1 флакон;
- 10) Стоп-раствор (1М серная кислота), бесцветная прозрачная жидкость, 25 мл – 1 флакон

3. Набор предназначен для выявления специфических антител к вирусу диареи КРС в сыворотке крови и в молоке.

Набор рассчитан на проведение одновременного анализа 184 исследуемых проб (в одном повторе) или 92 (в двух повторах). При этом на каждом планшете необходимо ставить по две контрольные пробы ( $K^+$  и  $K^-$ ) в двух повторах. При одновременном исследовании проб сывороток крови и молока ставится по четыре контрольные пробы в двух повторах на каждый планшет.

После скрининга проб в одном повторе пробы, вызывающие сомнения, рекомендуется исследовать в двух повторах.

Набор может быть использован для титрования положительных проб сывороток крови в серии двукратных разведений (1/5, 1/10, 1/20 и т.д.) в буфере для разведения образцов.

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 закупоренные флаконы (пробирки) соответствующей вместимости.

Пластиковые флаконы (пробирки) закупоривают завинчивающимися или защелкивающимися пластиковыми крышками. Стеклоянные флаконы закупоривают 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, 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, 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, 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, термостат, спектрофотометр с вертикальным лучом света для измерения оптической плотности при длине волны 450 нм.

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

## II. ПРИНЦИП МЕТОДА

7. В лунках планшета иммобилизован специфический антиген вируса диареи КРС.

#### **Для образцов сыворотки крови**

Метод основан на конкурентном взаимодействии конъюгированных с пероксидазой хрена моноклональных антител к белку р80/125 вируса диареи КРС и сывороточных вирусспецифических антител с иммобилизованным в лунках планшета антигеном вируса диареи.

При отсутствии в исследуемой сыворотке крови вирусспецифических антител, моноклональный конъюгат свободно взаимодействует с иммобилизованным в лунке антигеном вируса диареи КРС и, после добавления ТМБ, в лунке развивается окраска.

Если исследуемая сыворотка крови содержит вирусспецифические антитела, происходит их взаимодействие с иммобилизованным антигеном, его частичная или полная блокировка. В результате чего связывание антител конъюгата с антигеном не происходит или происходит частично и, соответственно, окрашивание отсутствует или интенсивность окраски снижается.

Таким образом, интенсивность окраски обратно пропорциональна количеству антител в исследуемой пробе.

#### **Для образцов молока**

Антиген вируса диареи КРС, сорбированный в лунках микропанели, образует комплекс со специфическими антителами, содержащимися в пробах молока КРС, который взаимодействует с антивидовым иммунопероксидазным конъюгатом против IgG КРС.

Пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе молока.

### **III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ**

#### **8. Подготовка к исследованию**

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

###### *8.1.1. Подготовка проб сывороток крови*

Для анализа используют сыворотку крови КРС. Образцы хранят при температуре 4°C не более 3-х суток, при температуре минус 20°C – до 50-60 суток.

Замороженные образцы в течение 5-10 мин нагревают в водяной бане при температуре 37°C.

В случае выпадения осадка в пробах их осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 2000 об/мин.

Гемолизированные и контаминированные пробы не пригодны для анализа. Многократное замораживание и оттаивание образцов не допускается.

В реакции пробы сыворотки используют в разведении 1/5 в буферном растворе.

###### *8.1.2. Подготовка проб молока*

Для анализа используют как индивидуальные, так и сборные пробы молока.

Сборная проба молока представляет собой пул индивидуальных проб, взятых от 2-50 животных. Образцы хранят при температуре 4°C не более 3-х суток, при температуре минус 20°C – до 50-60 суток.

Замороженные образцы в течение 5-10 мин нагревают в водяной бане при температуре 37°C.

Многократное замораживание и оттаивание образцов не допускается.

Перед анализом пробы должны быть обезжирены путем центрифугирования в течение 10 минут при 2000 – 3000 об/мин. Вместо центрифугирования пробы можно выдержать в холодильнике минимум 16 часов. Пипеткой отбирают жидкость для анализа из-под слоя сливок. Обезжиренные пробы хранят при минус 20°C.

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

8.2.1. Перед началом работы все реагенты, за исключением конъюгата, выдерживают не менее 30 мин при комнатной температуре (22±3)°C и перемешивают.

8.2.2. *Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов (ФСБТ)*. Содержимое флакона (компонент 8) 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 ФСБТ стабилен при температуре 4°C в течение 3 сут. Для более длительного хранения раствор заморозить и хранить при -20° С.

8.2.3. *Буфер для разведения образцов и конъюгата (БР)*. Представляет собой рабочий раствор ФСБТ (п.8.2.2.).

8.2.4. *Рабочий раствор конъюгата для сывороток крови* (компонент 6 – под желтой крышкой) *и для молока* (компонент 7 – под зеленой крышкой). 100-кратный концентрат конъюгата развести в БР в соотношении 1/100. (Пример: для приготовления 10 мл рабочего раствора конъюгата, рассчитанного на один планшет, к 9,9 мл БР добавить 100 мкл 100-х концентрата конъюгата).

**Внимание! Конъюгат следует разводить непосредственно перед использованием. 100-кратный концентрат конъюгата должен находиться при температуре от 2 до 8°С.**

8.2.5. *Контрольные пробы сывороток крови* (компоненты 2 и 3) используют в реакции, разведенными в БР 1/5.

8.2.6. *Контрольные пробы молока* (компоненты 4 и 5), субстратный раствор (ТМБ, компонент 9) и стоп-раствор (компонент 10) – готовы к применению.

## 9. Проведение анализа проб сыворотки крови

9.1. В четыре лунки планшета внести по 100 мкл разведенных в БР 1/5 контрольных проб сывороток крови  $K^+$  и  $K^-$  (в 2-х повторях).

В остальные лунки планшета внести по 100 мкл исследуемых проб сывороток крови, разведенных 1/5 в БР. (Сыворотки можно разводить непосредственно в лунках планшета: к 80 мкл БР добавить 20 мкл образца, тщательно перемешивая содержимое лунок).

Стрипы закрыть липкой пленкой и инкубировать 1 час в термостате при температуре 37°C.

**Не промывая** планшет в каждую лунку с сыворотками крови добавить по 50 мкл конъюгата для сыворотки, приготовленного п. 8.2.4. Содержимое лунок осторожно перемешать. Инкубировать 1 час при комнатной температуре (22±3)°С.

9.2. После окончания инкубации планшет 5 раз промыть рабочим раствором ФСБТ, приготовленным по п. 8.2.2, на автоматическом промывочном устройстве или вручную, доверху заполняя лунки (по 300 мкл/лунку). Затем жидкость окончательно удалить и планшет подсушить постукиванием по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

**Внимание! При этой процедуре возможно выпадение стрипов из рамки. Рекомендуется перед началом работы стрипы промаркировать.**

9.3. В каждую лунку внести по 100 мкл ТМБ, инкубировать 15 минут при комнатной температуре в темноте.

9.4 Реакцию остановить внесением по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.

Для определения титра положительной пробы сыворотки крови в лунках стрипа готовят серию двукратных разведений в БР (от 1/5 – 1/640). (В ряд А вносят 160 мкл БР, добавляют 40 мкл исследуемой сыворотки. Тщательно пипетируют. В остальные лунки стрипа вносят по 100 мкл БР. Далее проводят последовательные разведения, перенося по 100 мкл из предыдущей лунки в последующую). При этом, как указано в п. 9.1, используют две контрольные сыворотки в двух повторях.

## 9.5. Учет и интерпретация результатов

9.5.1. После остановки реакции (в течение 5 мин) проводят измерение оптической плотности субстратной смеси на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм ( $A_{450}$ ).

9.5.2. Вычисляют средние арифметические значения оптической плотности контрольных проб сывороток крови ( $A_{450} K^+_{\text{СЫВ}}$  и  $A_{450} K^-_{\text{СЫВ}}$ ).

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

$(A_{450} K_{\text{сыв}}^+)$  должна быть меньше 0,4  
 $(A_{450} K_{\text{сыв}}^-)$  должна быть больше 0,8

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют. Если  $A_{450}$  для контрольных проб сывороток крови соответствуют вышеуказанным критериям, далее проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

9.5.4. Определяют отсекающие значения (Cut off):

Отрицательный Cut off =  $(A_{450} K_{\text{сыв}}^-) \times 0,55$   
Положительный Cut off =  $(A_{450} K_{\text{сыв}}^-) \times 0,5$

9.5.5. Проводят интерпретацию результатов:

Вычисляют средние арифметические значения оптической плотности для каждой опытной пробы ( $A_{450}$  ОП) (если пробы исследовали в двух повторах).

Пробу считают отрицательной, если  $A_{450}$  ОП > отрицательного Cut off.

Пробу считают положительной, если  $A_{450}$  ОП < положительного Cut off.

Если  $A_{450}$  ОП находится между значениями положительного Cut off и отрицательного Cut off, к полученным результатам следует относиться как к сомнительным и, по возможности, повторить анализ.

В случае, если проба титровалась, титром антител считают последнее разведение сыворотки крови, для которого  $A_{450}$  ОП  $\leq$  положительному Cut off.

## 10. Проведение анализа проб молока

10.1. В четыре лунки планшета внести по 100 мкл контрольных проб молока  $K_{\text{мол}}^+$  и  $K_{\text{мол}}^-$  (в 2-х повторах).

В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых проб молока (индивидуальных или сборных).

Стрипы закрыть липкой пленкой и инкубировать 45 минут в термостате при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

10.2. Планшет 4 раза промыть рабочим раствором ФСБТ по п. 9.2.

10.3. В каждую лунку внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата для молока. Инкубировать 30 мин в термостате при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Промыть 5 раз по п. 9.2.

10.4. В каждую лунку внести по 100 мкл ТМБ, инкубировать 15 минут при комнатной температуре в темноте.

Остановить реакцию внесением по 100 мкл стоп-раствора.

## 10.5. Учет и интерпретация результатов

10.5.1. После остановки реакции (в течение 5 мин) проводят измерение оптической плотности субстратной смеси на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм ( $A_{450}$ ).

10.5.2. Вычисляют средние арифметические значения оптической плотности контрольных проб молока ( $A_{450} K_{\text{мол}}^+$ ) и ( $A_{450} K_{\text{мол}}^-$ ).

10.4.3. Результаты реакции считаются достоверными, если контрольные показатели соответствуют следующим критериям:

$(A_{450} K_{\text{мол}}^+)$  должен быть больше 0,8  
 $(A_{450} K_{\text{мол}}^-)$  должен быть меньше 0,25

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют. Если  $A_{450}$  для контрольных проб соответствуют вышеуказанным критериям, далее проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

#### 10.4.4. Интерпретация результатов:

Вычисляют средние арифметические значения оптической плотности для каждой опытной пробы ( $A_{450}$  ОП) (если пробы исследовали в двух повторях).

Определяют для каждой пробы относительное содержание антител

$$S/P = A_{450} \text{ ОП пробы} / A_{450} K_{\text{мол.}}^+$$

Если  $S/P \geq 0,3$  – пробу молока считают положительной

Если  $S/P \leq 0,3$  – пробу молока считают отрицательной

### 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.