



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

03 ФЕВ 2022

**ИНСТРУКЦИЯ**  
по применению набора  
для выявления антител к антигену вируса лейкоза  
крупного рогатого скота (ВЛКРС) иммуноферментным методом  
**«ВЛКРС-СЕРОТЕСТ плюс»**  
(Организация - производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

**I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ**

1. Набор для выявления антител к антигену вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) иммуноферментным методом «ВЛКРС-СЕРОТЕСТ плюс».

2. Состав набора и внешний вид компонентов.

1) Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках специфическим белком gp51 ВЛКРС – 2 штуки;

2) Положительная контрольная сыворотка ( $K^+$ ), содержит антитела к ВЛКРС – жидкость от светло-желтого до светло-коричневого цвета, 1,4 мл – 1 пробирка;

3) Отрицательная контрольная сыворотка ( $K^-$ ), не содержит антител к ВЛКРС, жидкость от светло-желтого до светло-коричневого цвета, 1,4 мл – 1 пробирка;

4) Конъюгат – моноклональные антитела к белку gp51 – 100-кратный концентрат, бесцветная прозрачная жидкость, 0,4 мл – 1 пробирка;

5) Промывочный буфер (ФСБТ) - 20-кратный концентрат, бесцветная жидкость, 25 мл – 4 флакона;

6) Субстратный раствор (ТМБ), бесцветная прозрачная жидкость, 30 мл – 1 флакон;

7) Стоп-раствор (1М серная кислота), бесцветная прозрачная жидкость, 25 мл – 1 флакон.

3. Набор предназначен для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотке крови и молоке.

Набор рассчитан на проведение одновременного анализа 184 исследуемых проб (в одном повторе) или 92 проб (в двух повторах) и двух контрольных проб на каждом планшете (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 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 (месяц и год).



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, 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 °С. Не переливать в другую посуду! Не смешивать компоненты из наборов разных партий!**

## II. ПРИНЦИП МЕТОДА

7. В лунках планшета иммобилизован специфический белок gp51 вируса лейкоза КРС.

Метод основан на конкурентном взаимодействии конъюгированных с пероксидазой хрена моноклональных антител к белку gp51 ВЛКРС и вирусспецифических антител в образцах с иммобилизованным в лунках планшета антигеном вируса лейкоза КРС.

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

Если исследуемая проба 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.

## ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

### 8. Подготовка к исследованию

#### 8.1. Подготовка биологического материала

Для анализа используют сыворотку крови и молоко КРС. Для исследования можно брать индивидуальные или сборные пробы сывороток крови. Сборная проба сывороток крови представляет собой пул индивидуальных сывороток, взятых от 2-10 животных.

При исследовании молока используют только индивидуальные образцы. Пробы следует хранить 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.

Пробы молока центрифугируют 15 мин при 2000-3000 об/мин для удаления липидов.

В случае выпадения осадка в пробах сыворотки крови 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.

## 8.2. Подготовка рабочих растворов

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

8.2.2. *Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов (ФСБТ)*. Содержимое флакона (компонент 5) разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой. (Пример: для получения 500 мл рабочего раствора к 25 мл концентрата добавляют 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°С в течение 3 сут. Для более длительного хранения раствор замораживают и хранят 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* - 100-кратный концентрат конъюгата (компонент 4) разводят в БР в соотношении 1/100. (Пример: для приготовления 2 мл рабочего раствора конъюгата, рассчитанного на два стрипа, к 1,98 мл БР добавляют 20 мкл 100-кратного концентрата конъюгата и тщательно перемешивают).

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

8.2.5. Контрольные сыворотки крови (компоненты 2 и 3) перед постановкой реакции разводят 1/2 в БР, приготовленным по п. 8.2.3. (Пример: для приготовления 210 мкл пробы, необходимой для двух лунок, к 105 мкл БР добавляют 105 мкл сыворотки и тщательно перемешивают). Также контрольные сыворотки можно развести непосредственно в лунках планшета.

8.2.6. Хромоген-субстратный раствор (ТМБ, компонент 6) и стоп-раствор (компонент 7) готовы к применению.

## 9. Проведение анализа

9.1. Положительная контрольная сыворотка ( $K^+$ ) и отрицательная контрольная сыворотка ( $K^-$ ) служат контролем для испытуемых проб сыворотки крови и молока. Контрольные сыворотки вносят в 2-х повторах.

9.2. Во все используемые лунки планшета (количество исследуемых проб + 4 лунки для контролей) внести по 50 мкл БР, затем, используя для каждого образца отдельный наконечник, внести по 50 мкл контрольных и испытуемых проб.

Содержимое лунок тщательно перемешать, закрыть планшет липкой пленкой и инкубировать 1 час при температуре 37°С.

9.3. Планшет 3 раза 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.*

9.4. Во все используемые лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, приготовленного по п. 8.2.4. Инкубировать 30 мин при температуре 37°С.

9.5. Промыть планшет 4 раза по п. 9.3.

9.6. В каждую лунку внести по 100 мкл ТМБ, инкубировать 10 мин при комнатной температуре в темноте.

Остановить реакцию внесением в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора.

## 10. Учет и интерпретация результатов

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

10.2. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности контрольных сывороток ( $A_{450} K^+$ ) и ( $A_{450} K^-$ ).



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

$(A_{450} K^-)$  должна быть больше 1,0

$(A_{450} K^-) / (A_{450} K^+)$  должно быть больше 5,0

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, то результаты ИФА следует считать недостоверными и реакцию повторить. Если  $A_{450}$  для контрольных сывороток соответствуют вышеуказанным критериям, далее провести оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

10.4. Определить отсекающие значения (Cut off):

**Отрицательный Cut off** =  $(A_{450} K^-) - [(A_{450} K^-) - (A_{450} K^+)] \times 0,4$

**Положительный Cut off** =  $(A_{450} K^-) - [(A_{450} K^-) - (A_{450} K^+)] \times 0,5$

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

10.5. Провести интерпретацию результатов:

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.

#### 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.