

КОПИЯ
ВЕРНА

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
Россельхознадзора

И.А.Власов
2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора

для выявления антител к антигену возбудителя гиподерматоза
крупного рогатого скота иммуноферментным методом
«ГИПОДЕРМА-СЕРОТЕСТ»

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

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к антигену возбудителя гиподерматоза крупного рогатого скота иммуноферментным методом «ГИПОДЕРМА-СЕРОТЕСТ».

2. В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

1. Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках рекомбинантным антигеном Гиподермин С (rHC) – 1 штука.
2. Положительный контроль сыворотки ($K^+ C$), жидкость от розового до красного цвета, $1,0 \text{ см}^3$ – 1 флакон.
3. Отрицательный контроль сыворотки ($K^- C$), жидкость от голубого до синего цвета, $1,0 \text{ см}^3$ – 1 флакон.
4. Положительный контроль молока ($K^+ M$), жидкость молочного цвета, $1,0 \text{ см}^3$ – 1 флакон.
5. Отрицательный контроль молока ($K^- M$), жидкость молочного цвета, $1,0 \text{ см}^3$ – 1 флакон.
6. 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с Твином 20 для промывки планшетов (ФСБГ), прозрачная бесцветная жидкость, $25,0 \text{ см}^3$ – 2 флакона.
7. Буфер для разведения образцов (БР), жидкость розового цвета, $15,0 \text{ см}^3$ – 2 флакона.
8. Буфер для разведения конъюгата (БРК), прозрачная жидкость от розового до красного цвета, $11,0 \text{ см}^3$ – 1 флакон.
9. Антитела к иммуноглобулину G (IgG) (H+L) крупного рогатого скота, меченные пероксидазой хрена (Конъюгат), прозрачная жидкость розового цвета, $0,3 \text{ см}^3$ – 1 флакон.
10. Субстратный раствор с перекисью водорода для разведения хромогена (СР), бесцветная прозрачная жидкость, $5,1 \text{ см}^3$ – 1 флакон.
11. Хромоген, тетраметилбензидин (ТМБ), бесцветная прозрачная жидкость, $5,1 \text{ см}^3$ – 1 флакон.
12. 1 М Серная кислота (Стоп-раствор), бесцветная прозрачная жидкость, $5,1 \text{ см}^3$ – 1 флакон.

3. Набор предназначен для выявления антител к антигену возбудителя гиподерматоза крупного рогатого скота в сыворотке крови и/или молоке с целью ранней диагностики гиподерматоза, выявления животных на ранней стадии заражения подкожным оводом и профилактики заболевания.

4. Набор рассчитан на проведение на одном планшете одновременного анализа 42 или 46 исследуемых проб сыворотки и/или молока (в 2 повторах) и четырех или двух контрольных проб (в 2 повторах).

Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения нескольких серий анализов по мере поступления биоматериала.

5. Упаковка и маркировка

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ШЕВЧЕНКО Ю.А.

Компоненты набора расфасовывают в пластиковые (стеклянные), герметично укупоренные флаконы (пробирки) соответствующей вместимости.

Пластиковые флаконы (пробирки) укупоривают заворачивающимися или зашелкивающимися пластиковыми крышками. Стеклоянные флаконы укупоривают резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми или пластиковыми заворачивающимися 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.

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 набора! Запрещается смешивать компоненты наборов разных серий, переливать в другую посуду и использовать набор по истечении срока годности.

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

7. Метод основан на взаимодействии иммобилизованного в лунках планшета рекомбинантного белка (rHC) со специфическими антителами из исследуемой пробы сыворотки крови (молока) и последующем выявлении полученного комплекса конъюгатом (меченными пероксидазой хрена специфическими антителами к IgG крупного рогатого скота). Связанная пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антител в определяемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Подготовка к исследованию

8.1. Подготовка биологического материала

Для анализа используют сыворотку крови или молоко от крупного рогатого скота. Если анализ проводят в течение 24 ч после отбора, образцы биоматериала хранят при

температуре 4°C . При более длительном хранении 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 пробах сыворотки крови их обязательно осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 2000g.

Перед анализом пробы молока центрифугируют при 2000g в течение 10 мин.

Многократное замораживание и оттаивание образцов сыворотки крови и молока не допускается.

8.2. Подготовка рабочих растворов

8.2.1. Перед началом работы все реагенты выдерживают не менее 30 мин при комнатной температуре ($20-25^{\circ}$) и тщательно перемешивают.

ВНИМАНИЕ. Оставшиеся после частичного использования компоненты должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя.

8.2.2. Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов (ФСБТ). Содержимое флакона № 6 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 стабилен при температуре 4°C в течение 3 сут. Для более длительного хранения раствор замораживают и хранят при минус 20°C .

8.2.3. Рабочий раствор конъюгата. Конъюгат (флакон № 9) развести в 50 раз буфером для разведения конъюгата (БРК, флакон № 8). (Пример: для получения 5 мл рабочего раствора к 0,1 мл Конъюгата добавляют 4,9 мл БРК). Раствор готовят непосредственно перед использованием.

8.2.4. Рабочий хромоген-субстратный раствор. Раствор хромогена (ТМБ - флакон № 11) разводят субстратным раствором (СР, флакон № 10) в соотношении 1:1 и перемешивают. (Пример: для получения 2 мл рабочего хромоген-субстратного раствора к 1 мл ТМБ добавляют 1 мл СР). Раствор готовят непосредственно перед использованием.

8.2.5. Положительный контроль сыворотки (K^{+}C , флакон № 2), отрицательный контроль сыворотки (K^{-}C флакон № 3, положительный контроль молока (K^{+}M флакон № 4), отрицательный контроль молока (K^{-}M , флакон № 5), буфер для разведения образцов (БР, флакон № 7), буфер для разведения конъюгата (БРК, флакон № 8), стоп-раствор (1 М серная кислота, флакон № 12) – готовы к применению.

9. Проведение анализа

9.1. Испытуемые пробы сыворотки крови разводят в 20 раз буфером для разведения образцов (БР). (Пример: для получения 300 мкл образца для исследования к 285 мкл БР добавляют 15 мкл сыворотки).

Все контрольные образцы и испытуемые пробы молока используют без разведения.

9.2. При исследовании только сыворотки или только молока в лунки A1-B1 и C1-D1 вносят по 100 мкл соответствующих контрольных проб (K^{+}C , K^{-}C или K^{+}M , K^{-}M). При исследовании на одном планшете проб сыворотки и молока используют все четыре контроля.

9.3. В остальные лунки планшета вносят по 100 мкл подготовленных по п.9.1 испытуемых образцов (по две лунки на каждый образец сыворотки или молока).

9.4. Закрывают планшет липкой пленкой и инкубируют 1 ч при 37°C .

9.5. Планшет 5 раз промывают рабочим буфером ФСБТ, подготовленным по п. 8.2.2., на автоматическом промывочном устройстве или вручную, доверху заполняя лунки (по 300 мкл/лунку), каждый раз полностью удаляя жидкость постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

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

9.6. В каждую лунку вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см. п.8.2.3.).

- 9.7. Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 ч при 37°C.
- 9.8. Планшет 5 раз промывают буфером ФСБТ (см. этап 9.5.).
- 9.9. Добавляют в каждую лунку по 100 мкл рабочего хромоген-субстратного раствора (п.8.2.4).
- 9.10. Планшет инкубируют 15 мин в темноте при комнатной температуре.
- 9.11. Останавливают реакцию добавлением 50 мкл стоп-раствора (1М H₂SO₄).
- 9.12. После остановки реакции оптическую плотность субстратной смеси измеряют на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм (A₄₅₀).
- 10. Учет и интерпретация результатов**
- 10.1. Вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности (A₄₅₀) для проб K⁺ (A₄₅₀ K⁺_{ср}) сыворотки и/или молока.
- 10.2. Вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности (A₄₅₀) для проб K⁻ (A₄₅₀ K⁻_{ср}) сыворотки и/или молока.
- 10.3. Вычисляют среднее значение оптической плотности (A₄₅₀) для каждой опытной пробы (ОП) (A₄₅₀ ОП_{ср}).
- 10.4. Вычисляют коэффициент связывания (K_{св}) конъюгата антителами по формуле:

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

ВНИМАНИЕ. K_{св} для проб сыворотки и молока рассчитывается относительно соответствующих контролей!

Пробу считают **отрицательной**, если величина K_{св} менее 25%.

Пробу считают **положительной**, если величина K_{св} более 30% ..

Если значение K_{св} лежит в области от 25 до 30%, 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 правил техники безопасности. При попадании их на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

12. Запрещается прием пищи и воды, курение в помещении, где проводятся работы с компонентами набора.

13. Набор следует хранить в местах, не доступных для детей.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим». Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамален, д. 16.

С утверждением настоящей инструкции утрачивает силу инструкция по применению набора для выявления антител к антигену возбудителя гиподерматоза крупного рогатого скота иммуноферментным методом «ГИПОДЕРМА-СЕРОТЕСТ», утвержденная Россельхознадзором 10. 06. 2008 г.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ ВГНКИ
Регистрационный номер ПВР-1-3.8/02148