

УТВЕРЖДАЮ

Директор
ФКП «Курская биофабрика»



В.М. Безгин

201 17 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

набора для выявления собак и других плотоядных, инфицированных *Brucella canis*, иммуноферментным методом

(Организация-разработчик: Федеральное казенное предприятие «Курская биофабрика – фирма «БИОК» (ФКП «Курская биофабрика»), г. Курск

I ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1 Набор для выявления собак и других плотоядных, инфицированных *Brucella canis*, иммуноферментным методом.

2 В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

- **компонент № 1** – полистироловый 96-луночный цельный или стрипованный планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках R-бруцеллезным антигеном – 2 шт.;

- **компонент № 2** – сыворотка крови кролика к R-бруцеллезному антигену (положительный контроль), прозрачная жидкость желтого или красноватого цвета, 0,2 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 3** – сыворотка крови кролика, не содержащая R-бруцеллезных антител (отрицательный контроль), прозрачная жидкость желтого или красноватого цвета, 0,2 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 4** – конъюгат – моноклональные антитела к R-бруцеллезному антигену, меченные пероксидазой, концентрированный (рабочее разведение указывается для каждой серии), прозрачная окрашенная жидкость, 0,5 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 5** – концентрат (х 20) промывочного буферного раствора, прозрачная бесцветная жидкость, 20,0 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 6** – концентрат (х 20) буферного раствора для разведения конъюгата, жидкость красного цвета, 5 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 7** – раствор субстрата (H₂O₂), прозрачная бесцветная жидкость, 22,0 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 8** – раствор хромогена (ТМБ), прозрачная бесцветная жидкость, 0,6 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 9** – останавливающий раствор (1 М раствор фосфорной кислоты), прозрачная бесцветная жидкость, 20,0 см³ – 1 флакон.

3 Компонент № 1 (96-луночный планшет) упакован в индивидуальный полиэтиленовый пакет с влагопоглотителем. Остальные компоненты набора расфасованы во флаконы из непрозрачного полиэтилена соответствующей вместимости, с завинчивающимися пробками.

На флаконы (пакеты) с компонентами нанесена следующая маркировка: наименование организации-производителя и ее товарный знак; название и номер компонента, объем во флаконе (см³); номер серии и дата выпуска (месяц, год); срок годности; условия хранения. На флаконе с компонентом № 4 указано рабочее разведение.

Компоненты набора упакованы в картонные коробки, обеспечивающие их целостность. На картонные коробки нанесена маркировка с указанием наименования, адреса, телефона и товарного знака организации-производителя; наименования набора; номера серии; перечня и количества компонентов набора; даты выпуска (месяц, год); срока годности (месяц, год); количества проб; условий хранения; надписи «Для ветеринарного применения». В каждую коробку вложена инструкция по применению набора.

4 Набор рассчитан на анализ 94 проб сывороток крови на каждом полистироловом планшете при единовременном использовании. Компонировка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения исследований в разное время по мере поступления биологического материала, в этом случае количество анализируемых проб уменьшается на количество контрольных проб (2) при проведении каждого анализа.

5 Срок годности компонентов набора – 12 месяцев от даты изготовления при условии хранения и транспортирования набора в защищённом от света месте и температуре от 2 °С до 8 °С. Набор после вскрытия можно использовать в течение 30 суток при соблюдении условий хранения. Запрещено смешивать компоненты наборов разных серий и использовать наборы по истечении срока годности. **Не допускается замораживание компонентов!**

6 При нарушении целостности и укупорки флаконов, упаковки полистироловых планшетов и пакетов, изменении цвета компонентов, наличии посторонней примеси, при отсутствии этикеток, а также по истечении срока годности набор выбраковывают, иммуноспецифические компоненты обеззараживают кипячением в течение 15 мин. Неиспользованные планшеты дезинфицируют в 3 % растворе хлорамина и утилизируют. Утилизация неспецифических компонентов наборов не требует специальных мер безопасности.

II ПРИНЦИП МЕТОДА

7 Метод основан на конкурентном взаимодействии конъюгированных с пероксидазой моноклональных антител к R-бруцеллезному антигену и R-LPS-бруцеллёзных антител (присутствующих в сыворотке крови исследуемого животного, инфицированного *Brucella canis*) за связывание с R-бруцеллезным антигеном, адсорбированным на поверхности лунок стрипов полистироловых планшетов с использованием моноклональных антител. При отсутствии в исследуемой сыворотке крови R-LPS-бруцеллёзных антител моноклональный конъюгат свободно взаимодействует и полностью связывается с адсорбированным на поверхности лунок стрипов полистироловых планшетов антигеном *Brucella canis*, формируя иммунный комплекс. Последний выявляется в процессе выполнения последовательных этапов конкурентного варианта иммуноферментного анализа (ИФА), включающих его взаимодействие с субстратной смесью и останавливающим раствором, в результате чего в лунке стрипа развивается окраска. Если исследуемая сыворотка содержит R-LPS-бруцеллёзные антитела, то они взаимодействуют с адсорбированным на поверхности лунок стрипов полистироловых планшетов антигеном *Brucella canis*, частично или полностью блокируя антиген. В результате связывание моноклонального конъюгата с антигеном не происходит или происходит частично и, соответственно, окрашивание в лунке стрипа отсутствует или интенсивность окраски снижается. Таким образом, интенсивность окраски реакционной смеси в лунке стрипа обратно пропорциональна концентрации антител в исследуемой сыворотке крови. С учетом результатов реакций с контрольными сыворотками, определяют наличие R-LPS-бруцеллёзных антител в исследуемом образце.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

Набор предназначен для выявления собак и других плотоядных, инфицированных *Brucella canis*, иммуноферментным методом.

8 Подготовка к исследованию

8.1 Для исследования используют сыворотки крови животных, невакцинированных против бруцеллеза, без признаков гемолиза и бактериальной контаминации, объёмом не ме-

нее 0,5 см³. Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 72 ч или при температуре не выше минус 20 °С в течение 60 суток после их получения. Размораживать образцы сыворотки крови необходимо в водяной бане при температуре (37,0 ± 0,5) °С. Не рекомендуется многократное замораживание и оттаивание образцов.

8.2 Для проведения ИФА требуются одно- и восьмиканальные пипетки переменного объёма до 0,01; 0,20; 1,0; 5,0 и 10,0 см³ со сменными наконечниками, мерная лабораторная посуда, термостат с температурой нагрева (37,0 ± 0,5) °С, дистиллированная вода, бытовой холодильник, фильтровальная бумага, контейнер, система промывания планшетов, которая распределяет по 0,3 см³ раствора в лунку, спектрофотометр (ридер) для микропланшетов любой модели с фильтром на 450 нм для учёта результатов ИФА.

8.3 Перед началом работы набор выдерживают 25 мин – 30 мин при комнатной температуре от 18 °С до 22 °С. Сразу после проведения анализа неиспользованные компоненты убирают в холодильник с температурой от 2 °С до 8 °С.

8.4 Перед началом работы составляют план проведения исследования.

8.5 Подготовка рабочих растворов

8.5.1 Промывочный буферный рабочий раствор. Компонент № 5 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают (например, для получения 200 см³ промывочного буферного рабочего раствора к 10 см³ концентрата добавляют 190 см³ дистиллированной воды).

8.5.2 Буферный рабочий раствор для разведения конъюгата. Компонент № 6 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают (например, для получения 50 см³ буферного раствора к 2,5 см³ концентрата добавляют 47,5 см³ дистиллированной воды). После разведения буферный рабочий раствор можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 5 суток.

8.5.3 Рабочий раствор конъюгата. Компонент № 4 разбавляют буферным рабочим раствором для разведения конъюгата согласно концентрации, указанной на этикетке. Например, имея 40-кратный концентрат, в расчёте на один планшет, к 0,25 см³ компонента № 4 добавляют 10,0 см³ буферного рабочего раствора. Рабочий раствор конъюгата хранить нельзя.

8.5.4 Субстратная смесь. **Субстратную смесь изготавливают после завершения промывания лунок.** Для приготовления 10 см³ раствора субстратной смеси, необходимого для проведения реакции на одном планшете, смешивают 10,0 см³ раствора компонента № 7 и 0,25 см³ раствора компонента № 8. Подготовленный раствор субстратной смеси должен быть бесцветным и стабильным в течение 15 мин. Раствор субстратной смеси с изменённым цветом не используют.

8.5.5 Компоненты набора №№ 2 и 3 (положительный и отрицательный контроли) и № 9 (останавливающий раствор) не требуют предварительной подготовки.

9 Постановка реакции

9.1 Наслаивание сывороток. Сыворотки крови плотоядных животных исследуют в разведении 1:10 в рабочем растворе конъюгата.

9.1.1 Из комплекта набора берут пакет с компонентом № 1 (полистироловым 96-луночным планшетом для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках R-бруцеллезным антигеном). При необходимости отбирают требуемое количество стрипов, помещают в рамку-держатель и маркируют водостойким маркером из-за возможного выпадения их из рамки во время проведения исследования. Неиспользованные стрипы помещают в пакет с влагопоглотителем и хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С. Неиспользуемые лунки цельного планшета можно сохранить для дальнейшего использования, если немедленно заклеить их герметичной водонепроницаемой плёнкой. Компонент №1 (планшет) используют однократно.

9.1.2 В лунки стрипов полистиролового планшета в соответствии с подготовленным планом исследования вносят по 0,09 см³ рабочего раствора конъюгата, подготовленного согласно п. 8.5.3.

9.1.3 Внесение контролей

9.1.3.1 В лунку A1 полистиролового планшета вносят 0,01 см³ компонента № 2 (положительного контроля).

9.1.3.2 В лунку В1 полистиролового планшета вносят $0,01 \text{ см}^3$ компонента № 3 (отрицательного контроля).

Внесение контролей в лунки А1 и В1 не обязательно, они могут быть внесены в другие лунки планшета. **Необходимо тщательное перемешивание сывороток в лунках.**

9.1.4 В остальные лунки полистиролового планшета вносят по $0,01 \text{ см}^3$ испытуемых проб сывороток крови.

Для внесения каждой пробы сыворотки крови используют новый наконечник.

9.2 Полистироловый планшет накрывают крышкой и инкубируют 1 ч (± 5 мин) при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

9.3 Промывание лунок планшета

Содержимое лунок полистиролового планшета удаляют, используя автоматические или ручные промывающие системы, в крайнем случае, допускается встряхивание. Все лунки планшета промывают 5 раз рабочим промывочным буферным раствором, подготовленным по 8.5.1 (по $0,3 \text{ см}^3$ в каждую лунку), затем раствор удаляют. Во время обработки большого количества планшетов (с целью синхронизации этапов) можно оставлять планшеты с промывочным буферным раствором до 20 мин.

После последнего промывания необходимо осторожно постучать планшетом по впитывающему материалу (фильтровальной бумаге) с целью полного удаления содержимого лунок.

9.4 Обнаружение (внесение субстратного раствора)

В каждую лунку полистиролового планшета вносят по $0,1 \text{ см}^3$ субстратного раствора, подготовленного согласно п. 8.5.4. Вносить раствор необходимо аккуратно, не касаясь лунок планшета.

Планшет накрывают крышкой и инкубируют при температуре от $18 ^\circ\text{C}$ до $24 ^\circ\text{C}$ в защищённом от прямых солнечных лучей месте от 1 мин до 5 мин до проявления ярко выраженного синего окрашивания в лунке с отрицательным контролем.

9.5 Остановка реакции

В каждую используемую лунку полистиролового планшета вносят по $0,08 \text{ см}^3$ компонента № 9 (останавливающего раствора). Не допускается контакт наконечника, содержащего останавливающий раствор, с содержимым лунки, так как перенос окрашенного раствора из лунки в лунку или резервуар с раствором может исказить результаты. Тщательно вытирают наружную нижнюю поверхность планшета.

9.6 Учёт реакции

Результаты анализа учитывают инструментальным способом. Сразу после остановки реакции измеряют оптическую плотность (ОП) продуктов реакции в каждой лунке, используя спектрофотометр (ридер) для микропланшетов с вертикальным лучом света при длине волны 450 нм. Перед проведением измерений устанавливают «0» фотометра по воздуху.

10 Оценка результатов реакции

10.1 Оценивают величины оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами №№ 2 и 3 (контрольными сыворотками крови):

Результаты считают достоверными, если: величина оптической плотности, полученная в реакции с компонентом № 2 (ОП^+) $< 0,300$ оптических единиц (опт. ед.) и

отношение между величинами ОП, полученными в реакциях с контрольными компонентами №№ 3 и 2 равно или больше 5: $\text{ОП}^-(\text{компонент № 3}) / \text{ОП}^+(\text{компонент № 2}) \geq 5$.

10.2 Если значения величин оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами №№ 2 и 3, не соответствуют указанным критериям, результаты считаются недостоверными и исследование проводят повторно.

10.3 Если отношения величин оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами №№ 2 и 3, соответствуют вышеуказанным критериям, то проводят оценку результатов реакций в лунках с испытуемыми пробами сыворотки.

10.4 Оценку результатов реакции испытуемых проб проводят по величине коэффициента (K), который рассчитывают по формуле:

$$K = \frac{ОП_{положительного\ контроля}}{ОП_{испытуемой\ сыворотки}} \times 100$$

Реакцию считают отрицательной для образцов сывороток крови, значение K которых равно или меньше 14,0.

Реакцию считают положительной для образцов сыворотки крови, значение K которых равно или выше 16,0.

Реакцию считают сомнительной для образцов сыворотки крови, значение K которых больше 14,0, но меньше 16,0.

11. Диагностическая оценка результатов

11.1 Животных, при положительном результате реакции, считают инфицированными *Brucella canis*.

11.2. Животных, при сомнительном результате реакции, исследуют повторно через 15 и 30 дней.

В случае получения при повторном исследовании через 30 дней сомнительного результата реакции при снижении величины коэффициента (K), инфицирование животных *Brucella canis* исключают; при повышении величины коэффициента (K), животных считают инфицированными *Brucella canis*.

11.3. Животных, исследованных первично с сомнительным результатом, до получения результатов, исключающих диагноз на бруцеллез, содержат изолированно.

IV МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

12 Меры личной профилактики при проведении диагностических исследований с использованием набора сводятся к соблюдению санитарно-эпидемиологических правил и техники безопасности при работе с биологическим материалом.

13 В случае попадания компонентов набора и исследуемого материала на открытые участки тела или слизистые оболочки, их смывают большим количеством водопроводной воды с мылом.

14 Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Организация – производитель – ФКП «Курская биофабрика» (305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5).

Адрес места производства ФКП «Курская биофабрика» (305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5).

Наименование и адрес организации, уполномоченной на принятие претензий от потребителя: ФКП «Курская биофабрика», 305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5.