



УТВЕРЖДАЮ

Директор
ФКП «Курская биофабрика»

В.М. Безгин

«09» февраля 2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотке крови и молоке иммуноферментным методом
(Вариант № 2 – верификация*)

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

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1 Набор для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотке крови и молоке крупного рогатого скота иммуноферментным методом (Вариант № 2 – верификация).

2 В состав набора входят следующие компоненты:

K1 – полистироловый 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа с иммобилизованными в лунках гликопротеидным антигеном (gp51) BLV** (нечётные ряды) и контрольным отрицательным антигеном (чётные ряды) – 2 планшета;

K2 – положительный контроль: сыворотка крови крупного рогатого скота, содержащая антитела к gp51 BLV, цельная, прозрачная жидкость соломенно-жёлтого или красноватого цвета, 0,2 см³ – 1 флакон;

K3 – отрицательный контроль: сыворотка крови крупного рогатого скота, не содержащая антител к gp51 BLV, цельная, прозрачная жидкость соломенно-жёлтого или красноватого цвета, 0,2 см³ – 1 флакон;

K4 – положительный контроль: молоко, содержащее антитела к gp51 BLV, цельное, жидкость белого цвета, 1,0 см³ – 1 флакон;

K5 – отрицательный контроль: молоко, не содержащее антител к gp51 BLV, цельное, жидкость белого цвета, 1,0 см³ – 1 флакон;

K6 – антивидовой конъюгат (моноклональные антитела к IgG крупного рогатого скота, меченные пероксидазой), концентрированный, жидкость розового цвета, 0,5 см³ – 1 флакон;

K7 – концентрат (× 20) буферного раствора для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата, жидкость красного цвета, 20,0 см³ – 1 флакон;

K8 – концентрат (× 20) промывочного буферного раствора, прозрачная бесцветная жидкость, 20,0 см³ – 2 флакона;

K9 – раствор субстрата (H₂O₂), прозрачная бесцветная жидкость, 22,0 см³ – 1 флакон;

K10 – раствор хромогена (ТМБ), прозрачная бесцветная жидкость, 0,6 см³ – 1 флакон;

K11 – стоп-раствор (1 М раствор фосфорной кислоты), прозрачная бесцветная жидкость, 20,0 см³ – 1 флакон.

3 Компонент K1 (96-луночный планшет) упакован в индивидуальный полиэтиленовый пакет с влагопоглотителем. Остальные компоненты набора расфасованы во флаконы из непрозрачного полиэтилена соответствующей вместимости, с завинчивающимися пробками.

*Верификация (лат. *verificatio* – доказательство, подтверждение), в диагностике – проверка, подтверждение специфичности антител или антигенов в испытуемой пробе.

**BLV (*bovine leukaemia virus*) – вирус лейкоза крупного рогатого скота.

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 К6 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 45 проб сыворотки крови крупного рогатого скота и/или молока на каждом планшете. Комплектация набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения исследований по мере поступления биологического материала.

5 Срок годности компонентов набора – 18 месяцев от даты выпуска 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 набор 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 РЕАКЦИИ

7 Принцип непрямого варианта ИФА заключается в выявлении комплекса, образованного антигеном, иммобилизованным с помощью моноклональных антител на поверхности лунок полистиролового планшета и специфическими антителами, содержащимися в пробах сыворотки крови или молока крупного рогатого скота. Специфический комплекс взаимодействует с антивидовым конъюгатом моноклональных антител к IgG крупного рогатого скота с пероксидазой и обнаруживается по изменению окраски раствора в результате химических превращений субстрата и хромогена. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8 Вариант № 2 ИФА набора (верификация) предназначен для подтверждения специфичности антител в пробах сыворотки крови и молока крупного рогатого скота, исследованных с положительным результатом с использованием варианта № 1 ИФА набора, при отрицательных результатах исследования в РИД и как самостоятельный тест.

9 Подготовка к исследованию

9.1 Материалом для исследования служат индивидуальные пробы сыворотки крови крупного рогатого скота, молоко, молозиво и секрет вымени сухостойных коров.

9.2 Для исследования используют сыворотки крови крупного рогатого скота без признаков гемолиза и бактериальной контаминации, объёмом не менее 0,5 см³. Допускается хранение образцов сыворотки 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.

9.3 Пробы молока, молозива и секрета вымени сухостойных коров (объёмом не менее 5 см³) обезжиривают путём центрифугирования в течение 15 мин при 2000-3000 об/мин, по-

сле расслоения на два слоя – верхний (жировой) и нижний (обезжиренный) – осторожно прокалывают верхний жировой слой и отбирают в отдельную пробирку около 1 см³ жидкого нижнего слоя.

9.4 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, холодильник низкотемпературный (минус 40 °С), центрифуга, 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.

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

9.6 Перед началом работы составляют план проведения исследования.

10 Приготовление рабочих растворов

10.1 Раствор №1 – буферный рабочий раствор для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата.

Для приготовления раствора №1 К7 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают. Например, для получения 200 см³ буферного раствора к 10 см³ концентрата добавляют 190 см³ дистиллированной воды. После разведения буферный рабочий раствор можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 5 суток.

10.2 Раствор №2 – промывочный буферный рабочий раствор.

Для приготовления раствора №2 К8 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают. Например, для получения 400 см³ промывочного буферного рабочего раствора к 20 см³ концентрата добавляют 380 см³ дистиллированной воды. После разведения промывочный буферный рабочий раствор можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 5 суток.

10.3 Раствор №3 – рабочий раствор конъюгата.

Для приготовления раствора №3 К6 разбавляют буферным рабочим раствором для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата согласно концентрации, указанной на этикетке. Например, имея 40-кратный концентрат, в расчёте на один планшет, к 0,25 см³ К6 добавляют 10,0 см³ раствора №1. Рабочий раствор конъюгата нельзя хранить.

10.4 Раствор №4 – раствор субстратной смеси – **изготавливают после завершения промывания лунок.**

Для приготовления 10 см³ раствора субстратной смеси, необходимых для проведения реакции на одном планшете, смешивают 10,0 см³ раствора субстрата (К9) и 0,25 см³ раствора хромогена (К10). Подготовленный раствор субстратной смеси должен быть бесцветным и стабильным в течение 15 мин. Раствор субстратной смеси с изменённым цветом не используют.

10.5 Компоненты набора К4 и К5 (положительный и отрицательный контроли) и К11 (стоп-раствор) не требуют предварительной подготовки.

11 Постановка реакции

11.1 Из комплекта набора берут пакет с планшетом (К1), в лунках которого иммобилизован антиген gr51 BLV (нечётные ряды) и контрольный отрицательный антиген (чётные ряды). 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.

11.2 Внесение испытуемых проб

11.2.1 Разведение сывороток. Все контрольные и испытуемые пробы сывороток разводят 1:26 буферным рабочим раствором для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата (Раствор №1) непосредственно в лунках планшета. С этой целью

в лунки планшета (стрипов) вносят по $0,1 \text{ см}^3$ раствора №1 и добавляют по $0,004 \text{ см}^3$

- в лунки A1, A2, B1 и B2 – положительного контроля (K2);
- в лунки C1 и C2 – отрицательного контроля (K3);
- в лунки D1 и D2 – испытуемой пробы сыворотки крови № 1;
- в лунки E1 и E2 – испытуемой пробы сыворотки крови № 2;
- в лунки F1 и F2 – испытуемой пробы сыворотки крови № 3 и т.д.

После внесения сывороток крови необходимо перемешать содержимое лунок осторожным вращением планшета в горизонтальной плоскости.

11.2.2 Внесение проб молока

Пробы молока исследуют без разведения. В лунки планшета (стрипов) вносят по $0,1 \text{ см}^3$

- в лунки A1, A2, B1 и B2 – положительного контроля (K4);
- в лунки C1 и C2 – отрицательного контроля (K5);
- в лунки D1 и D2 – испытуемой пробы молока № 1;
- в лунки E1 и E2 – испытуемой пробы молока № 2;
- в лунки F1 и F2 – испытуемой пробы молока № 3 и т.д.

Для внесения каждой пробы сыворотки крови и молока используют новый наконечник.

Допускается проведение исследований сывороток крови, молока, молозива и секрета вымени сухостойных коров на одном планшете. В этом случае в лунки планшета вносят все четыре контроля (компоненты K2 – K5).

Для повышения достоверности результатов рекомендуется внесение проб испытуемых сывороток или молока в двух повторностях.

Внимание! Для контрольных образцов (компонентов K2 и K4) постановка в двух повторностях обязательна.

11.3 Планшет закрывают крышкой (или плёнкой) и инкубируют 1 ч (± 5 мин) при температуре ($37,0 \pm 0,5$) °C.

11.4 Промывание лунок планшета

Содержимое лунок планшета удаляют, используя автоматические или ручные промывающие системы, в крайнем случае, допускается вытряхивание. Лунки планшета промывают три раза промывочным буферным рабочим раствором (Раствором №2), внося по $0,3 \text{ см}^3$ в каждую лунку, затем удаляя раствор. Во время обработки большого количества планшетов с целью синхронизации этапов можно оставлять планшеты с промывочным раствором до 20 мин.

После последнего промывания жидкость полностью удаляют постукиванием перевернутого планшета по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге.

11.5 Внесение конъюгата

В каждую лунку планшета вносят по $0,1 \text{ см}^3$ рабочего раствора конъюгата (Раствор №3). Планшет закрывают крышкой (или плёнкой) и инкубируют 1 ч (± 5 мин) при температуре ($37,0 \pm 0,5$) °C.

11.6 Промывание лунок планшета

Четырёхкратно проводят процедуру промывания лунок планшета, описанную в п. 11.4.

11.7 Внесение раствора субстратной смеси

В каждую лунку планшета вносят по $0,1 \text{ см}^3$ раствора субстратной смеси (Раствор №4). Планшет закрывают крышкой и инкубируют при температуре от 18 °C до 24 °C в защищённом от прямых солнечных лучей месте от 2 мин до 10 мин до достижения ярко выраженного синего окрашивания в лунках с положительными контролями (компонентами K2 и K4), внесёнными в лунки с иммобилизованным гликопротеидным антигеном (gp51) BLV (нечётные ряды A1 и B1).

11.8 Остановка реакции

В каждую используемую лунку планшета вносят по $0,08 \text{ см}^3$ K11 (стоп-раствора).

12 Учёт результатов реакции

12.1 Результаты анализа учитывают инструментальным способом. Сразу после остановки реакции измеряют оптическую плотность (ОП) продуктов реакции в каждой лунке при

длине волны 450 нм, используя спектрофотометр (ридер) для микропланшетов с вертикальным лучом света. Перед проведением измерений устанавливают «0» фотометра по воздуху.

12.2 Вычисляют величину $\Delta ОП$ для контролей и испытуемых проб установлением разницы между величинами ОП в лунках со специфическим гликопротеидным антигеном (gp51) BLV (нечётный ряд), ($ОП_{BLV}$) и контрольным отрицательным антигеном (чётный ряд), ($ОП_{контроль}$): $\Delta ОП = ОП_{BLV} - ОП_{контроль}$.

12.3 Результаты реакции считаются достоверными и могут быть учтены, если контрольные показатели соответствуют критериям:

- среднее значение ОП отрицательных контролей ($ОП_{ср}^-$) в лунках нечётного ряда (со специфическим гликопротеидным антигеном (gp51) BLV) и чётного ряда (с контрольным отрицательным антигеном) должно быть не выше 0,300 оптических единиц (о.е.) для К3 и 0,250 о.е. для К5;

- значение $\Delta ОП^-$ отрицательных контролей должно быть не выше 0,200 о.е. для К3 и 0,100 о.е. для К5;

- среднее значение $\Delta ОП^+$ положительных контролей должно быть не ниже 0,500 о.е. для К2 и для К4.

12.4 Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты считаются недостоверными и исследование проводят повторно.

12.5 Оценку результатов реакции испытуемых проб проводят по величинам ОП.

Реакцию считают **отрицательной** для проб сыворотки крови или молока, в реакции с которыми получена величина $\Delta ОП < 0,2$ о.е.

12.6 Для испытуемых проб сыворотки крови или молока, в реакции с которыми получена величина $\Delta ОП \geq 0,2$ о.е., оценку результатов реакции проводят по величине коэффициента (К), который рассчитывают по формуле:

$$K = \frac{\Delta ОП_{испытуемой\ пробы}}{ОП_{ср}^-}.$$

Реакцию считают **положительной** для проб сыворотки крови или молока, если значение $K > 2,0$.

Реакцию считают **отрицательной** для проб сыворотки крови или молока, если значение $K \leq 2,0$.

IV МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

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

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

15 Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

16 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).

Инструкция по применению набора для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотке крови и молоке иммуноферментным методом (Вариант № 1 – скрининг) разработана специалистами ФКП «Курская биофабрика» (305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5) и ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ФГБНУ ВИЭВ) (109428, РФ, Москва, Рязанский проспект, 24, корп. 1).