

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
Россельхознадзора
Н.А. Власов
27.03.2009г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора для диагностики бруцеллёза
крупного рогатого скота иммуноферментным методом
(организация-производитель ФГУП «Курская биофабрика», г. Курск)

I ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1 Набор для диагностики бруцеллёза крупного рогатого скота иммуноферментным методом.

2 В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

- **компонент № 1** – полистироловые 96-луночные планшеты для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках антигеном *B. abortus* – 2 планшета;

- **компонент № 2** – анти-*B. abortus* сыворотка крови крупного рогатого скота (положительный контроль), прозрачная жидкость жёлтого или красноватого цвета, 0,1 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 3** – «отсекающая» сыворотка крови крупного рогатого скота, прозрачная жидкость жёлтого или красноватого цвета, 0,1 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 4** – отрицательная сыворотка крови крупного рогатого скота (отрицательный контроль), прозрачная жидкость жёлтого или красноватого цвета, 0,1 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 5** – конъюгат – моноклональные антитела к IgG крупного рогатого скота, меченные пероксидазой, рабочее разведение 1:50 (указывается для каждой серии), прозрачная окрашенная жидкость, 0,5 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 6** – концентрат (х 20) промывочного буферного раствора, прозрачная бесцветная жидкость, 20,0 см³ – 2 флакона;

- **компонент № 7** – концентрат (х 20) буферного раствора для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата, прозрачная бесцветная жидкость, 20 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 8** – раствор субстрата (H₂O₂), прозрачная бесцветная жидкость, 22,0 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 9** – раствор хромогена (ТМБ), прозрачная бесцветная жидкость, 0,6 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 10** – останавливающий раствор (0,2 М раствор серной кислоты), прозрачная бесцветная жидкость, 12,5 см³ – 1 флакон.

3 Компонент № 1 (96-луночные планшеты) упакован в индивидуальные полиэтиленовые пакеты с влагопоглотителем. Остальные компоненты набора расфасованы во флаконы из непрозрачного полиэтилена соответствующей вместимости.

На этикетки упаковки с компонентом № 1 и флаконы с компонентами №№ 6 – 8 и 10 нанесена следующая маркировка: название, адрес и товарный знак организации-производителя, наименование компонента, объём компонента в единице упаковки (в шт. и см³), номер государственной регистрации, номер серии и дата изготовления (месяц, год), срок годности, условия хранения, способ применения, меры предосторожности, информация

о подтверждении соответствия, надпись «Для животных», обозначение действующего СТО. На флаконы с компонентами №№ 2 – 5 и 9 нанесена следующая маркировка: название организации-производителя, наименование компонента, объем компонента в единице упаковки (в см³), срок годности и номер серии.

Компоненты набора упакованы в картонные коробки, обеспечивающие их целостность. На картонные коробки нанесена маркировка с указанием названия, адреса и товарного знака организации-производителя; наименования набора; номера серии; номера государственной регистрации; перечня и количества компонентов набора; даты изготовления; срока годности; условий хранения; способа применения; мер предосторожности; информации о подтверждении соответствия; надписи «Для животных»; обозначения действующего СТО. В каждую коробку вложена инструкция по применению набора.

4 Набор рассчитан на анализ 93 проб сывороток крови крупного рогатого скота на каждом полистироловом планшете при одновременном использовании. Комплектация 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 (3) при проведении каждого анализа.

5 Срок годности компонентов набора – 12 месяцев от даты изготовления при условии хранения и транспортирования набора в защищенном от света месте и температуре от 2 °С до 8 °С. 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 плесени и 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.

II ПРИНЦИП МЕТОДА

7 S-LPS-бруцеллезные антитела, присутствующие в сыворотке крови крупного рогатого скота, инфицированного *Brucella spp.* в S-форме, образуют комплекс с антигеном, адсорбированным на поверхности лунок стрипов полистироловых планшетов с использованием моноклональных антител. Комплекс антиген-антитело выявляется в процессе выполнения последовательных этапов непрямого ИФА, включающих его взаимодействие с антивидовым конъюгатом (моноклональными антителами к иммуноглобулинам крупного рогатого скота с пероксидазой), субстратной смесью и останавливающим раствором. Интенсивность окраски реакционной смеси в лунке стрипа прямо пропорциональна концентрации антител в исследуемой сыворотке крови.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

Набор предназначен для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота, не иммунизированного бруцеллезными вакцинами, иммунизированного неагглютиногенными бруцеллезными вакцинами или иммунизированного слабоагглютиногенными бруцеллезными вакцинами (из штаммов *B. abortus* 82, 75/79-AB или аналогичных), но не ранее чем через 6 месяцев после введения вакцины.

Животных, иммунизированных вакциной из штамма *B. abortus* 19, - не исследуют.

8 Подготовка к исследованию

8.1 Для исследования используют сыворотки крови крупного рогатого скота без признаков гемолиза и бактериальной контаминации, объемом 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 $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Не рекомендуется многократное замораживание и оттаивание образцов.

8.2 Для проведения ИФА требуются одно- и восьмиканальные пипетки переменного объема до 0,01; 0,20; 1,0; 5,0 и 10,0 см³ со сменными наконечниками, мерная лабораторная посуда, термостат с температурой нагрева $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, 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 температуре от 18°C до 22°C . Сразу после проведения анализа неиспользованные компоненты убирают в холодильник с температурой от 2°C до 8°C .

8.4 Перед началом работы составляют план проведения исследования.

8.5 Подготовка рабочих растворов

8.5.1 Промывочный буферный рабочий раствор. Компонент № 6 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).

8.5.2 Буферный рабочий раствор для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата. Компонент № 7 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°C до 8°C в течение 5 суток.

8.5.3 Подготовка проб контрольных (компонентов №№ 2, 3 и 4) и испытуемых сывороток крови.

Контрольные и испытуемые сыворотки разводят предварительно в 200 раз. Для этого в лунки плексигласового 72-луночного планшета вносят по 1 см³ буферного рабочего раствора для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата, подготовленного согласно п. 8.5.2, и добавляют контрольные и испытуемые сыворотки в объёме по 0,005 см³. После внесения сывороток содержимое лунок перемешивают, используя для каждого образца новый наконечник.

8.5.4 Рабочий раствор конъюгата. Компонент № 5 разбавляют в 50 раз буферным рабочим раствором для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата, подготовленным согласно п. 8.5.2. Например, из расчёта на 1 планшет к 0,2 см³ компонента № 5 добавляют 10,0 см³ буферного рабочего раствора. Рабочий раствор конъюгата хранить нельзя.

8.5.5 Субстратная смесь. Субстратную смесь изготавливают после завершения промывания лунок. Из расчёта, что для проведения исследования на 1 планшете требуется 10 см³ субстратной смеси, смешивают 10,0 см³ раствора компонента № 8 и 0,25 см³ раствора компонента № 9. Подготовленный раствор субстратной смеси должен быть бесцветным и стабильным в течение 15 мин. Раствор субстратной смеси с изменённым цветом не используют.

8.5.6 Компонент № 10 (останавливающий раствор) подготовки не требует.

9 Постановка реакции

9.1 Наслаивание сывороток

9.1.1 Вскрывают пакет с компонентом № 1 (полистироловым 96-луночным планшетом для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках антигеном *B. abortus*). При необходимости отбирают требуемое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранят в полиэтиленовом пакете с влагопоглотителем, при температуре от 2°C до 8°C .

9.1.2 В лунки стрипов полистиролового планшета вносят по 0,05 см³ буферного рабочего раствора для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата, в соответствии с подготовленным планом исследования.

9.1.3 Внесение контролей

9.1.3.1 В лунку A1 полистиролового планшета вносят 0,05 см³ компонента № 2 (положительного контроля) в разведении 1:200.

9.1.3.2 В лунку B1 полистиролового планшета вносят $0,05 \text{ см}^3$ компонента № 4 (отрицательного контроля) в разведении 1:200.

9.1.3.3 В лунку C1 полистиролового планшета вносят $0,05 \text{ см}^3$ компонента № 3 («отсекающей» сыворотки крови крупного рогатого скота) в разведении 1:200.

Внесение контролей в лунки A1, B1, C1 не обязательно, они могут быть внесены в другие лунки планшета.

9.1.4 В остальные лунки полистиролового планшета вносят по $0,05 \text{ см}^3$ испытуемых проб сыворотки крови крупного рогатого скота в разведении 1:200.

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

Стрипы нумеруют водостойким маркером из-за возможного выпадения их из рамки-держателя во время тестирования.

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

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

9.4 Наслаивание конъюгата

В каждую лунку полистиролового планшета вносят по $0,1 \text{ см}^3$ рабочего раствора конъюгата, подготовленного согласно п. 8.5.4. Планшет накрывают крышкой и инкубируют 1 ч (± 5 мин) при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

9.5 Промывание лунок планшета

Повторяют процедуру промывания лунок планшета, описанную в п. 9.3 (на данном этапе 4 промывания).

9.6 Обнаружение реакции (внесение субстратного раствора)

В каждую лунку полистиролового планшета вносят по $0,1 \text{ см}^3$ субстратного раствора, подготовленного согласно п. 8.5.5. Планшет накрывают крышкой и инкубируют 10 мин при температуре от $22 ^\circ\text{C}$ до $24 ^\circ\text{C}$ в защищенном от прямых солнечных лучей месте.

9.7 Остановка реакции

В каждую используемую лунку полистиролового планшета вносят по $0,05 \text{ см}^3$ компонента № 10 (останавливающего раствора). Перенос окрашенного раствора из лунки в лунку или в резервуар с раствором может исказить результаты. Тщательно вытирают наружную нижнюю поверхность планшета.

9.8 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. Предварительно спектрофотометр бланкируют по воздуху.

10 Оценка результатов реакции

10.1 Оценивают величины оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами №№ 2 и 4 (контрольными сыворотками крови):

Результаты считают достоверными, если величина оптической плотности, полученная в реакции с компонентом № 2 (ОП^+), $> 0,500$ оптических единиц (опт. ед.) и отношение между величинами оптической плотности, полученными в реакциях с компонентами №№ 2 и 4 ($\text{ОП}^+ / \text{ОП}^-$) равно или больше 5.

10.2 Если значения величин оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами №№ 2 и 4, 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 4, соответствуют вышеуказанным критериям, то проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми пробами сывороток.

10.4 Для каждой испытуемой пробы сыворотки по нижеприведённой формуле рассчитывают величину коэффициента активности (K):

$$K = \frac{ОП_{испытуемой\ сыворотки}}{ОП_{отсекающей\ сыворотки}}$$

Реакцию считают отрицательной для образцов сыворотки крови, значение K которых равно или меньше 1.0.

Реакцию считают положительной для образцов сыворотки крови, значение K которых равно или больше 1.3.

Реакцию считают сомнительной для образцов сыворотки крови, значение K которых больше 1.0, но меньше 1.3.

11 Интерпретация результатов

11.1 При выявлении в благополучных по бруцеллёзу стадах крупного рогатого скота, не иммунизированного против бруцеллёза или иммунизированного неагглютиногенными бруцеллёзными вакцинами, или не ранее чем через 6 месяцев после иммунизации слабоагглютиногенными бруцеллёзными вакцинами, животных, исследованных с положительным результатом, считают больными бруцеллёзом.

При сомнительном результате иммуноферментного анализа пробы сыворотки крови от этих животных исследуют повторно через 30 суток. При сохранении коэффициента активности сыворотки на прежнем уровне проводят ещё одно исследование через 30 суток. В случае сохранения коэффициента активности сыворотки на исходном уровне или его снижения заболевание животных бруцеллёзом исключают. При повышении коэффициента активности сыворотки в любом из повторных исследований заболевание животных бруцеллёзом считают установленным.

11.2 При выявлении в неблагополучных по бруцеллёзу стадах крупного рогатого скота, не иммунизированного против бруцеллёза или иммунизированного неагглютиногенными бруцеллёзными вакцинами, или не ранее чем через 6 месяцев после иммунизации слабоагглютиногенными бруцеллёзными вакцинами, животных, исследованных с положительным или сомнительным результатом, считают больными бруцеллёзом.

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 Запрещается приём пищи, воды, курение, использование косметических средств в помещении, где проводят работу с набором.

15 Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция по применению набора разработана ФГУП «Курская биофабрика» (г. Курск, ул. Разина, 5) и ФГУ «ВГНКИ» (Москва, Звенигородское шоссе, 5).

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ «ВГНКИ»

Регистрационный номер ПВР- 1-9.8/02349