



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотке крови и молоке иммуноферментным методом
(Вариант № 1 – скрининг)
(организация-производитель ФГУП «Курская биофабрика», г. Курск)

1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

2 В состав набора входят следующие компоненты:

K1 – полистироловый 96-луночный цельный или стрипованный планшет для иммуноферментного анализа с иммобилизованным в лунках гликопротеидным антигеном (gp51 BLV** – 2 планшета;

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

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

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

K5 – молоко, не содержащее антител к gp51 BLV (отрицательный контроль), 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 (0,2 М раствор серной кислоты), прозрачная бесцветная жидкость, 12,5 см³ – 1 флакон.

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

На этикетки упаковки с компонентом K1 и флаконы с компонентами K7 – K9 и K11 нанесена следующая маркировка: наименование, адрес, телефон и товарный знак организации производителя; название и номер компонента, его объём 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

*Скрининг (англ. *screening*, от *screen* просеивать, сортировать, отбирать) – это метод, позволяющий путем массового обследования группы или популяции идентифицировать особи, имеющие искомый признак (например, антитела к возбудителю того или иного инфекционного заболевания).

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

подтверждении соответствия; надпись «Для животных»; обозначение действующего стандарта.

На флаконы с компонентами К2 – К6 и К10 нанесена следующая маркировка: наименование, адрес, телефон и товарный знак организации-производителя; название и номер компонента, его объём в единице упаковки (в см³); срок годности и номер серии. 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; номера государственной регистрации; перечня и количества компонентов набора; даты изготовления (месяц, год); срока годности (месяц, год); условий хранения; мер предосторожности; информации о подтверждении соответствия; надписи «Для животных»; обозначения действующего стандарта. В каждую коробку вложена инструкция по применению набора.

4 Набор рассчитан на анализ 92 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 – 12 месяцев от даты изготовления при условии хранения и транспортирования набора в защищённом от света месте и температуре от 2 °С до 8 °С. 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 пробе: сыворотки крови или молока крупного рогатого скота. Специфический комплекс взаимодействует с антивидовым конъюгатом моноклональных антител к IgG крупного рогатого скота пероксидазой и обнаруживается по изменению окраски раствора в результате химической превращений субстрата и хромогена. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8 Набор предназначен для диагностики индуцированной BLV инфекции, мониторинг эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота и проведении оздоровительных мероприятий.

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

*ИФА – иммуноферментный анализ

сыворотки крови необходимо в водяной бане при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Не рекомендуется многократное замораживание и оттаивание образцов.

9.3 Пробы молока, молозива и секрета вымени сухостойных коров (объёмом не менее 5 см^3) обезжиривают путём центрифугирования в течение 15 мин при 2000-3000 об/мин. после расслоения на два слоя – верхний (жировой) и нижний (обезжиренный) – осторожно прокалывают верхний жировой слой и отбирают в отдельную пробирку около 1 см^3 жидкой нижней части.

9.4 Для проведения ИФА требуются одно- и восьмиканальные пипетки переменного объёма до 0.01; 0.20; 1.0; 5.0 и 10.0 см^3 со сменными наконечниками, мерная лабораторная посуда, термостат с температурой нагрева $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, дистиллированная вода, бытовой холодильник, холодильник низкотемпературный (минус 40°C), центрифуга, фильтровальная бумага, контейнер, система промывания планшетов, которая распределяет по 0.3 см^3 раствора в лунку, спектрофотометр (ридер) для микропланшетов любой модели с фильтром на нем для учёта результатов ИФА.

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

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. К7 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают. Например, для получения 200 см^3 буферного раствора к 10 см^3 концентрата добавляют 190 см^3 дистиллированной воды. После разведения буферный рабочий раствор можно хранить при температуре от 2°C до 8°C в течение 5 суток.

10.2 Раствор №2 – промывочный буферный рабочий раствор. К8 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают. Например, для получения 400 см^3 промывочного буферного рабочего раствора к 20 см^3 концентрата добавляют 380 см^3 дистиллированной воды. После разведения промывочный буферный рабочий раствор можно хранить при температуре от 2°C до 8°C в течение 5 суток.

10.3 Раствор №3 – рабочий раствор конъюгата. К6 (концентрат конъюгата) разбавляют буферным рабочим раствором для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата согласно концентрации, указанной на этикетке. Например, имея кратный концентрат, в расчёте на один планшет, к 0.25 см^3 К6 добавляют 10.0 см^3 буферного раствора №1. Рабочий раствор конъюгата нельзя хранить.

10.4 Раствор №4 – раствор субстратной смеси – изготавливают после завершения промывания лунок. Для приготовления 10 см^3 раствора субстратной смеси, необходимого для проведения реакции на одном планшете, смешивают 10.0 см^3 К9 (раствора субстрата 0.25 см^3 К10 (раствора хромогена). 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 контроль) и (стоп-раствор) не требуют предварительной подготовки.

10.6 Не допускается использование некачественных растворов (колонии микроорганизмов, мутность).

11 Постановка реакции

11.1 Из комплекта набора берут пакет с планшетом (К1), в лунках которого иммобилизован антиген gp51 BLV. 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 влаготителем и хранят в холодильнике. Неиспользуемые лунки цельного планшета можно сохранить для дальнейшего использования. Компонент К1 (планшет) используют однократно.

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 (K1). С этой целью в лунки планшета (стрипов) вносят по 0,1 см³ раствора №1 и добавляют по 0,004 см³

- в лунки A1 и B1 - положительного контроля (K2);
- в лунки C1 и D1 - отрицательного контроля (K3);
- в остальные лунки - испытуемых проб сыворотки крови.

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) K1 вносят по 0,1 см³

- в лунки A1 и B1 - положительного контроля (K4);
- в лунки C1 и D1 - отрицательного контроля (K5);
- в остальные лунки - испытуемых проб молока.

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 в четыре контроля (компоненты K2 - K5) в двух повторностях.

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

Внимание! Для контрольных образцов (компонентов K2 - K5) постановка в двух повторностях обязательна.

11.3 Планшет закрывают крышкой (или пленкой) и инкубируют 1 ч (± 5 мин) при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

11.4 Промывание лунок планшета

Содержимое лунок планшета удаляют, используя ручные или автоматические промывающие системы. в крайнем случае, допускается вытряхивание. Лунки планшета промывают три раза промывочным буферным рабочим раствором (Раствором №2), внося по 0,3 см³ каждую лунку, затем удаляя раствор. Во время обработки большого количества планшетов целью синхронизации этапов можно оставлять планшеты с промывочным раствором 20 мин.

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

11.5 Внесение конъюгата

В каждую лунку планшета вносят по 0,1 см³ рабочего раствора конъюгата (Раствор №3). Планшет закрывают крышкой (или пленкой) и инкубируют 1 ч (± 5 мин) при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

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 см³ раствора субстратной смеси (Раствор №4). Планшет накрывают крышкой и инкубируют при температуре от 18 °C до 24 °C в защищённом от прямых солнечных лучей месте от 1 мин до 10 мин до достижения ярко выраженного синего окрашивания в лунках с положительными контролями.

11.8 Остановка реакции

В каждую используемую лунку планшета вносят по 0,05 см³ K11 (стоп-раствора).

12 Учёт результатов реакции

Учёт результатов реакции проводят визуально или с использованием спектрофотометра в сравнении с положительным и отрицательным контролями.

12.1 Визуальный учёт. При отсутствии приборов реакцию учитывают визуально:

- в лунках с компонентами К2 и К4 развивается сине-голубое окрашивание раствора, которое изменяется на жёлтое после остановки реакции;
- в лунках с компонентами К3 и К5 раствор не окрашивается;
- окрашивание контрольных проб в двух повторностях должно быть близким по интенсивности;

- в лунках с исследуемыми образцами сывороток крови крупного рогатого скота или молока, в которых присутствуют специфические антитела к ВЛВ, развивается сине-голубое окрашивание раствора, которое становится жёлтым после остановки реакции. Интенсивности реакции зависят от количества присутствующих антител.

Реакцию считают положительной, если интенсивность окрашивания раствора в лунке с исследуемым образцом заметно выше по сравнению с окрашиванием раствора в лунках с отрицательным контролем (К3 и К5).

Реакцию считают отрицательной, если интенсивность окрашивания раствора в лунке с исследуемым образцом не отличается от интенсивности окрашивания раствора в лунке с отрицательным контролем (К3 и К5).

12.2 Инструментальный учёт. 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.

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

- среднее значение ОП положительных контролей (ОП⁺) должно быть не ниже 0,450 о.е. для К2 и 0,500 о.е. для К4;
- среднее значение ОП отрицательных контролей (ОП⁻) должно быть не выше 0,200 о.е. для К3 и 0,100 о.е. для К5;
- отношение между средними величинами положительных и отрицательных контролей: ОП⁺ (К2) / ОП⁻ (К3) ≥ 2,0; ОП⁺ (К4) / ОП⁻ (К5) ≥ 5,0.

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

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

$$K = \frac{ОП_{испытуемый\ пробы}}{ОП^-}$$

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

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

12.3 Пробы сыворотки крови и молока, исследованные с положительным результатом для подтверждения специфичности антител исследуют с помощью набора ИФА (Вариант 1 и 2).

IV МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

13 Работы с набором должны проводиться в специально оборудованном помещении с соблюдением элементарных правил предосторожности и личной гигиены с использованием средств индивидуальной защиты. При соблюдении указанных правил использование набора не представляет опасности для здоровья человека. 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.

V ПОРЯДОК ПРЕДЪЯВЛЕНИЯ РЕКЛАМАЦИИ

Контроль набора, поступившего с рекламацией, проводит организация-производитель, а при разногласиях в оценке качества набора между потребителем и производителем контроль проводит профильный отдел ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

Организация-производитель – Федеральное государственное унитарное предприятие «Курская биофабрика – фирма «БИОК».

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

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ «ВГНКИ»

Регистрационный номер ПВР- 1-2.9/02399

С утверждением настоящей инструкции утрачивает силу инструкция по применению набора для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотке крови и молоке иммуноферментным методом от 10 июня 2009 г.