



Набор диагностический для выявления индивидуальных специфических антител класса G к бактериям рода Brucella в сыворотке (плазме) крови грызунов иммуноферментным методом (ИФА)

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

1. Общие сведения

1.1 Настоящая инструкция распространяется на «Бруцелла -IgG-антитела ИФА ВЕТ» – набор диагностический для выявления индивидуальных специфических антител класса G к бактериям рода Brucella в сыворотке (плазме) крови грызунов (мышей, крыс, морских свинок, хомяков, шиншил, кроликов и др. животных отряда грызуны) иммуноферментным методом (ИФА).

2. Состав и форма выпуска

Набор включает следующие компоненты:

- Полистироловый 96-луночный планшет** с адсорбированной в лунках планшета смесью специфических антигенов Brucella – один;
- Флакон №1. Фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСБ-Т)** – прозрачная, слегка опалесцирующая, бесцветная жидкость, 26 мл – 1 флакон;
- Флакон №2. Разводящий буферный раствор для сывороток (РБР-С)** – прозрачная опалесцирующая жидкость фиолетового цвета, 12 мл – 1 флакон;
- Флакон №3. Раствор конъюгата, конъюгированного с пероксидазой хрена (РКг- G)** – прозрачная опалесцирующая жидкость красного цвета, 12 мл – 1 флакон;
- Флакон №4. Положительный контрольный образец (К+)** – инактивированная сыворотка крови животных, содержащая специфические антитела класса G к бактериям рода Brucella, красного цвета, 1,5 мл – 1 флакон;
- Флакон №5. Отрицательный контрольный образец (К-)** – инактивированная сыворотка крови животных, не содержащая специфических антител к бактериям рода Brucella – прозрачная, слегка опалесцирующая, жидкость желтого цвета, 2,5 мл – 1 флакон;
- Флакон №6. Хромоген – тетраметилбензидин – субстрат (ТМБ – субстрат)** – бесцветная или светло-желтого цвета жидкость, 12 мл – 1 флакон;
- Флакон №7. Стоп-реагент** – прозрачная бесцветная жидкость, 6 мл – 1 флакон.

3. Упаковка

3.1 Компоненты набора расфасовывают в пластиковые, герметично укупоренные флаконы соответствующей вместимости. На флаконах с компонентами должны быть этикетки с указанием: организации – производителя и его товарного знака, номера компонента, наименования компонента, количества во флаконе, номера серии, срока годности (месяц год). Полистироловый планшет укупоривают в индивидуальный фольгированный полиэтиленовый пакет с влагопоглотителем и снабжают этикеткой с указанием: организации – производителя и его товарного знака, наименования антигена, сорбированного в лунках планшета, номера серии, срока годности (месяц год).

3.2 Компоненты набора упакованы в картонные коробки с наличием гнезд или перегородок, обеспечивающих целостность флаконов. На коробке должна быть этикетка с указанием: организации – производителя и его товарного знака, полного названия набора, номера серии и контроля набора, срока годности (месяц, год), условий хранения и обозначения ТУ. В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

3.3 Набор диагностический рассчитан на **96 определений**, включая контрольные образцы. Компонировка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения нескольких исследований по мере поступления биологического материала.

3.4 Срок годности компонентов набора – 18 месяцев от даты изготовления при хранении их в сухом, темном месте при температуре от 2 до 8 °С. Запрещено смешивать компоненты наборов разных серий и использовать набор по истечении срока годности. **Не допускается замораживание компонентов.**

При нарушении целостности и укупорки флаконов, упаковки планшета, изменении цвета содержимого, наличия посторонних примесей, при отсутствии этикеток, а также в случае неиспользования в пределах срока годности набор выбрасывают, а иммуноспецифические компоненты обеззараживают кипячением в течение 15 мин. Неиспользованные планшеты дезинфицируют в 3% растворе хлорамина.

4. Меры личной профилактики

4.1 Несмотря на то, что набор диагностический «Бруцелла -IgG-антитела ИФА ВЕТ» является полностью биологически безопасным, с ним следует обращаться, как с потенциально инфекционным материалом:

- не пипетировать растворы ртом,
- работать в перчатках резиновых;
- все использованные материалы подвергать обработке раствором спирта этилового с объемной долей 76 % или раствором водорода перекиси с массовой долей 6 % с последующей выдержкой при комнатной температуре не менее 2 ч.

Работу с химическими компонентами набора следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. При попадании их на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промывать пораженное место большим количеством водопроводной воды. Запрещается прием пищи и воды, курение в помещении, где проводятся работы с компонентами набора.

5. Принцип метода

5.1 Бактериальный антиген, адсорбированный в лунках планшета, связывается со специфическими антителами, присутствующими в сыворотке крови, в результате чего формируется комплекса антиген-антитело. Полученный иммунный комплекс выявляется конъюгатом, фермент которого, после добавления субстрата, вызывает разложение субстрат-индикаторного раствора и образование растворимого окрашенного продукта. При этом интенсивность окраски раствора в лунке пропорциональна содержанию антител в исследуемом материале.

6. Порядок применения

6.1 Для исследования в лабораторию доставляют из хозяйств индивидуальные сыворотки крови крупного рогатого скота 0,3 – 3,0 мл. Сыворотки можно хранить при температуре 4 °С не более 3 суток или при температуре минус 20 °С в течение 5 – 50 суток. Для постановки ИФА необходимы одно- и многоканальные автоматические микропипетки разных объемов со сменными наконечниками, мерная

лабораторная посуда, одноразовые ванночки для компонентов реакции, дистиллированная вода, спектрофотометр (ридер) с фильтром на 450 нм. Перед началом работы планшеты и все компоненты набора выдерживают 20 – 30 минут при комнатной температуре. Неиспользованные реагенты убирают в холодильник (2 – 8 °С) сразу же после проведения исследования.

6.2 Приготовление рабочих растворов реагентов:

ФСБ-Т – концентрированный раствор буфера (флакон № 1) разводят в 25 раз дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Для этого содержимое одного флакона концентрата (26 мл) переносят в мерную колбу и доводят объём до 650 мл дистиллированной водой. Если в концентрате присутствуют кристаллы, то его перед разведением нагревают и тщательно взбалтывают. В случае использования одного или нескольких стрипов планшета в чистый флакон отобрать необходимое для данного исследования количество составных частей ФСБ-Т в соответствии с таблицей:

Составные части		Количество используемых стрипов											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Объем, мл	Концентрат ФСБ-Т, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26
	Вода дистиллированная, мл	48	96	144	192	240	288	336	384	432	480	528	624

Допускается хранить неиспользованный рабочий раствор ФСБ-Т в течение 5 суток в холодильнике (2 – 8 °С).

Все остальные компоненты набора готовы к употреблению.

6.3 Внимание! Окисляющие агенты, ионы металлов, моющие средства на посуде могут разлагать ТМБ. Во избежание ложных результатов необходимо тщательно отмывать посуду раствором кислоты серной 1 моль/л или кислоты соляной 1 моль/л с последующей отмывкой водой дистиллированной.

7. Проведение анализа

7.1 Для исследования сывороток крови в ИФА отбирают необходимое количество стрипов, нумеруют их в соответствии с описью исследуемых проб водостойким маркером из-за возможного выпадения из рамки-держателя во время тестирования. Оставшиеся стрипы хранят в полиэтиленовом пакете с влагопоглотителем, при температуре 4° С.

Для внесения контрольных сывороток можно использовать любые лунки планшета. Для этого в лунку внести по 100 мкл К+ (флакон № 4), в две другие лунки планшета – по 100 мкл К- (флакон №5). В остальные лунки планшета внести по 80 мкл РБР-С (флакон №2). При постановке ИФА на одном стрипе допускается использовать для К- и К+ - по одной лунке.

В остальные лунки планшета с РБР-С внести по 20 мкл исследуемых сывороток. Раствор перемешать пять раз пипетированием не касаясь дна лунки, цвет РБР-С должен измениться: происходит незначительное просветление раствора.

После внесения проб сывороток, планшет помещают в пластиковый пакет или накрывают крышкой и инкубируют 30 мин при 37 °С. После инкубации лунки освобождают от содержимого резким встряхиванием и пять раз промывают рабочим раствором ФСБ-Т, добавляя каждый раз по 300 мкл раствора на лунку, и выждав определенное время (от 30 сек до 1 минуты), вытряхивают содержимое. Во время обработки большого количества планшетов можно оставлять их с промывочным раствором до 20 минут. Затем планшет подсушивают постукиванием по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге. Во все используемые лунки микропанели вносят по 100 мкл раствора конъюгата (флакон № 3); планшет помещают в пластиковый пакет или накрывают крышкой и выдерживают 30 мин при 37 °С.

После повторной инкубации проводят процедуру промывания лунок рабочим раствором ФСБ-Т по описанной выше методике. После промывки во все используемые лунки микропанели вносят по 100 мкл раствора субстрата (флакон № 6) и выдерживают 30 минут при 37 °С в темноте. По истечению указанного времени реакцию останавливают добавлением в каждую используемую лунку по 50 мкл стоп-раствора (флакон № 7).

7.2 Оценка результатов реакции:

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют в двухволновом режиме 450 нм. относительно 630 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху. Результаты учитывают только в том случае, если в лунках с К- среднее значение ОП (ОПК-) не более 0,2, а разница средних значений между (ОПК+) и (ОПК-) превышает 0,35.

Рассчитывают ОПкрит. по формуле:

$$\text{ОПкрит.} = \text{ОПК-}(cp.) + 0,2,$$

где ОПК-(cp.) – среднее значение ОП (ОПК-) по двум лункам.

Если значение оптической плотности исследуемого образца не превышает 0,3 – то результат анализа считают отрицательным (IgG к бруцелле не определены).

Если значение оптической плотности исследуемого образца попадает в интервал от 0,3 до 0,9 – то результат анализа сомнительный. Рекомендуется повторить исследование такой сыворотки, а в случае повторного сомнительного результата провести исследование сыворотки, полученной из крови, взятой от данного животного повторно через 15-30 дней.

Если значение оптической плотности исследуемого образца превышает 0,9 – то результат анализа положительный.

8. Интерпретация результатов анализа

8.1 При выявлении в благополучных по бруцеллезу стадах крупного рогатого скота, не иммунизированного против бруцеллеза или иммунизированного неагглютиногенными противобруцеллезными вакцинами, или не ранее чем через 6 месяцев после иммунизации слабоагглютиногенными бруцеллезными вакцинами, животных, исследованных с положительным и сомнительным результатами ИФА, сыворотки крови последних подвергают дополнительным исследованиям комплексом серологических реакций (РА, РСК, РНГА со стандартными антигенами; РИД с О-ПС антигеном), по результатам которых осуществляют интерпретацию полученных результатов, в необходимых случаях в целях их дифференциальной эпизоотической оценки привлекая метод исследования парных сывороток (одновременное исследование сохраненных в холодильнике сывороток и сывороток крови, взятой от этих же животных через 15-30 дней, ИФА и комплексом серологических реакций со стандартными антигенами), бактериологическое исследование биоматериала от реагирующих животных, другие специальные методы, в том числе на базе НИУ.

8.2 При выявлении в неблагополучных по бруцеллезу стадах крупного рогатого скота, не иммунизированного против бруцеллеза или иммунизированного неагглютиногенными бруцеллезными вакцинами, или не ранее чем через 6 месяцев после иммунизации слабоагглютиногенными бруцеллезными вакцинами, животных с положительным результатом ИФА их считают больными бруцеллезом.

8.3 При выявлении в неблагополучных по бруцеллезу стадах крупного рогатого скота, не иммунизированного против бруцеллеза или иммунизированного неагглютиногенными бруцеллезными вакцинами, или не ранее чем через 6 месяцев после иммунизации слабоагглютиногенными бруцеллезными вакцинами, животных с сомнительным результатом ИФА рекомендуется повторить исследование в ИФА сывороток крови от этих животных, а в случае повторного сомнительного результата – провести исследование сыворотки, полученной из крови, взятой от данного животного повторно через 15-30 дней.

