



ООО НПФ «Сиббиотест»

НКО, наукоград Кольцово, ул. Технопарковая 1, оф. 225.
Тел. 8(383)336-50-91, E-mail: sibbiotest@ngs.ru

Утверждаю
Директор ООО НПФ
«Сиббиотест»

Шведкин Е.И.
« 16 » мая 2012 г.

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

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

1. Общие сведения

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

2. Состав и форма выпуска

Набор включает следующие компоненты:

- 2.1** полистироловый 96-луночный планшет с адсорбированной в лунках планшета смесью специфических антигенов *Mycoplasma* sp. – один;
- 2.2** – фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСБ-Т) – прозрачная, слегка опалесцирующая, бесцветная жидкость, 26 мл – 1 флакон;
- 2.3** – разводящий буферный раствор для сывороток (РБР-С) – прозрачная опалесцирующая жидкость фиолетового цвета, 12 мл – 1 флакон;
- 2.4** – раствор конъюгата, конъюгированного с пероксидазой хрена (РКг- G) – прозрачная опалесцирующая жидкость красного цвета, 12 мл – 1 флакон;
- 2.5** – положительный контрольный образец (К+) – инактивированная сыворотка крови животных, содержащая специфические антитела класса G к бактериям рода *Mycoplasma*, красного цвета, 1,5 мл – 1 флакон;
- 2.6** – отрицательный контрольный образец (К-) – инактивированная сыворотка крови животных, не содержащая специфических антител класса G к бактериям рода *Mycoplasma* – прозрачная, слегка опалесцирующая, жидкость желтого цвета, 2,5 мл – 1 флакон;
- 2.7** – хромоген – тетраметилбензидин – субстрат (ТМБ – субстрат) – бесцветная или светло-желтого цвета жидкость, 12 мл – 1 флакон;
- 2.8** – стоп-реагент – прозрачная бесцветная жидкость, 6 мл – 1 флакон.

3. Упаковка

3.1 Компоненты набора расфасовывают в пластиковые, герметично закупоренные 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 закупоривают 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. Компоновка 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 закупорки 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 Не смотря на то, что набор диагностический «Микоплазма -IgG-антитела ИФА ВЕТ» является полностью биологически безопасной, с ней 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 комплекс 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 индивидуальные сыворотки крови животных 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 объем 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 описанием исследуемых проб водостойким маркером из-за возможного выпадения из рамки-держателя во время тестирования. Оставшиеся стрипы хранят в полиэтиленовом пакете с влагопоглотителем, при температуре 4⁰ 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:

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

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

Если, значение оптической плотности исследуемого образца не превышает ОПкрит. – то пробу считают не реагирующей на микоплазмоз. Иными словами, результат анализа считают отрицательным.

Если значение оптической плотности исследуемого образца превышает ОПкрит. – то пробу считают реагирующей на микоплазмоз.

В случае получения показателя оптической плотности от ОПкрит. до 0,8 результат анализа считают сомнительным. В этом случае рекомендуется повторить анализ через 2 недели.

В случае получения показателя оптической плотности от 0,8 и выше, результат анализа считают положительным.

Организация - разработчик: ООО НПФ «Сиббиотест» совместно с ГНУ ИЭВСиДВ Россельхозакадемии.

Организация - производитель: ООО НПФ «Сиббиотест».