



Набор диагностический скрининговый поливалентный для предварительного выявления специфических антител класса G к возбудителю лептоспироза в сыворотке (плазме) крови грызунов иммуноферментным методом (ИФА)

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

1. Общие сведения

1.1. Настоящая инструкция распространяется на «Лептоспира -IgG-антитела ИФА-ВЕТ» – набор диагностический скрининговый поливалентный для предварительного выявления специфических антител класса G к возбудителю лептоспироза (серогруппы *Pomona*, *Tarassovi*, *Hebdomadis*, *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Sejroe* и *Canicola*) 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:

Полистироловый 96-луночный планшет с адсорбированной в лунках планшета смесью специфических антигенов *Leptospira interrogans* – 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, 8 мл. – 1 флакон;

Флакон №3. Раствор конъюгата белка G, 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 возбудителю лептоспироза (серогруппы *Pomona*, *Tarassovi*, *Hebdomadis*, *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Sejroe* и *Canicola*), красного цвета, 1,5 мл. – 1 флакон;

Флакон №5. Отрицательный контрольный образец (К -) – инактивированная сыворотка крови животных, не содержащая специфических антител к возбудителю лептоспироза – 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 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 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 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. Несмотря на то, что набор диагностический «Лептоспира -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 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 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 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 50 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 50 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 ОП крит. по формуле:

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

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

Если, значение оптической плотности исследуемого образца не превышает **ОП крит** – то пробу считают не реагирующей на лептоспироз (IgG к лептоспирам серогрупп *Pomona*, *Tarassovi*, *Hebdomadis*, *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Sejroe* и *Canicola* в ней не определены). Иными словами, результат анализа считают отрицательным.

Если значение оптической плотности исследуемого образца превышает **ОПкрит.** – то пробу считают реагирующей на лептоспироз (в ней могут находиться антитела к возбудителю лептоспироза из числа серогрупп *Pomona*, *Tarassovi*, *Hebdomadis*, *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Sejroe* и *Canicola* в любом сочетании).

В случае получения показателя оптической плотности от **ОПкрит.** до 0,8, результат анализа считают сомнительным.

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

8. Интерпретация результатов анализа

8.1. При выявлении сомнительно реагирующих в ИФА провести дополнительное исследование в ИФА «парных» проб (уже имеющихся с сомнительными результатами ИФА и взятых повторно от этих же животных через 2 недели после предыдущего исследования).

8.2. Животных с отрицательными и повторными сомнительными результатами ИФА по материалам исследований парных проб считают на данный момент эпизоотически не опасными в отношении лептоспироза.

8.3. Пробы сывороток крови животных с положительными результатами ИФА исследуют на лептоспироз в РМА (по максимуму – с каждым из антигенов лептоспир 7 серогрупп (*Pomona*, *Tarassovi*, *Hebdomadis*, *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Sejroe* и *Canicola*). По результатам этих исследований дальнейшие противолептоспирозные мероприятия проводят согласно существующим ветеринарным правилам, касающимся указанной болезни.

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

Организация - производитель: ООО НПФ «Сиббиотест».