



**Набор диагностический скрининговый поливалентный  
для предварительного выявления специфических антител класса G  
к возбудителю лептоспироза в сыворотке (плазме) крови животных  
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 сельскохозяйственных животных (КРС, МРС, свиньи, лошади) 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* – два;

**Флакон №1. Фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСБ-Т)** – прозрачная, слегка опалесцирующая, бесцветная жидкость, 26 мл. – 2 флакона;

**Флакон №2. Разводящий буферный раствор для сывороток (РБР-С)** – прозрачная опалесцирующая жидкость фиолетового цвета, 8 мл. – 2 флакона;

**Флакон №3. Раствор конъюгата, конъюгированного с пероксидазой хрена (РКг- G)** – прозрачная опалесцирующая жидкость красного цвета – 2 флакона, 12 мл;

**Флакон №4. Положительный контрольный образец (K +)** – 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. – 2 флакона;

**Флакон №5. Отрицательный контрольный образец (K -)** – инактивированная сыворотка крови животных, не содержащая специфических антител к возбудителю лептоспироза – прозрачная, слегка опалесцирующая, жидкость желтого цвета, 2,5 мл. – 2 флакона;

**Флакон №6. Хромоген – тетраметилбензидин – субстрат (ТМБ – субстрат)** – бесцветная или светло-желтого цвета жидкость, 12 мл. – 2 флакона;

**Флакон №7. Стоп-реагент** – прозрачная бесцветная жидкость, 6 мл. – 2 флакона.

**3. Упаковка**

**3.1** Компоненты набора расфасовывают в пластиковые, герметично укуренные 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 укупорируют 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 **192 определения**, 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 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 «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 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 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 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*, *Grippytyphosa*, *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*, *Grippytyphosa*, *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*, *Grippytyphosa*, *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».