УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
Россельхознадзора
Н.А.Власов
«21» сентября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антител
к респираторно-синцитиальному вирусу крупного рогатого скота
иммуноферментным методом «РСИ-СЕРОТЕСТ»
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к респираторно-синцитиальному вирусу (РСВ) крупного рогатого скота (КРС) в сыворотке крови иммуноферментным методом «РСИ-СЕРОТЕСТ».

2. В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках антигеном РСВ – 2 штуки;

2). Положительный контроль (**К$^+$**), прозрачная жидкость светло-желтого цвета, 0,3 см^3 – 1 пробирка;

3). Отрицательный контроль (**К$^-$**), прозрачная жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, 0,3 см^3 – 1 пробирка;

4). Моноклональные антитела к РСВ, меченные пероксидазой хрена (**Конъюгат**), 100-кратный концентрат, прозрачная жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, 0,25 см^3 – 1 пробирка;

5). 20-кратный концентрат буферного раствора для промывки планшетов, разведения сывороток и конъюгата (**ФСБТ**), прозрачная жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, 25,0 см^3 – 3 флакона;

6). Субстратный раствор с хромогеном (**СР**), бесцветная прозрачная жидкость, 25,0 см^3 – 1 флакон;

7). **Стоп-раствор**, бесцветная прозрачная жидкость, 25,0 см^3 – 1 флакон.

3. Набор «РСИ-СЕРОТЕСТ» предназначен для выявления специфических антител к респираторно-синцитиальному вирусу крупного рогатого скота в сыворотке крови больных, подозрительных на заболевание, экспериментально зараженных и вакцинированных животных методом иммуноферментного анализа (ИФА). Набор позволяет проводить как скрининговые исследования сывороток в одном разведении, так и определение титра антител в индивидуальных сыворотках.

Набор рассчитан на проведение на одном планшете одновременного анализа 46 исследуемых проб сывороток (в 2 повторах) и двух контрольных проб (в 2 повторах) или определения титра антител к РСВ в 11-12 пробах. Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения нескольких серий анализов по мере поступления биоматериала.

4. Упаковка и маркировка

Компоненты набора расфасовывают в пластиковые (стеклянные), герметично укупоренные флаконы (пробирки) соответствующей вместимости.

Пластиковые флаконы (пробирки) укупоривают завинчивающимися или защелкивающимися пластиковыми крышками. Стеклянные флаконы укупоривают резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми или пластиковыми завинчивающимися колпачками.

На флаконы (пробирки) с каждым компонентом наклеивают этикетки с указанием: названия и/или товарного знака организации-производителя и разработчика, краткого названия набора, краткого названия компонента, его номера, количества в упаковке, номера серии, номера контроля, срока годности (месяц и год).

Полистироловые планшеты упаковывают в индивидуальные полиэтиленовые пакеты. На пакеты наклеивают этикетки с указанием: названия и/или товарного знака организации-

производителя и разработчика, краткого названия набора, названия адсорбированного компонента, номера серии и контроля, срока годности.

Флаконы (пробирки) с компонентами набора и планшеты упаковывают в картонные или пластиковые коробки с наличием гнезд.

На каждую коробку с диагностическим набором наклеивают этикетку, в которой указывают: страну, город, название и/или товарный знак организации-производителя и разработчика, полное название набора, номер серии и номер контроля, дату изготовления (месяц и год), срок годности (месяц и год), условия хранения, регистрационный номер, знак соответствия в системе ГОСТ Р, обозначение нормативного документа, надпись «для животных». В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

5. Срок годности компонентов набора - 12 месяцев от даты изготовления при условии хранения и транспортирования их в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С. Не допускается замораживание компонентов набора (за исключением сывороток)! Запрещается смешивать компоненты наборов разных серий, переливать в другую посуду и использовать набор по истечении срока годности.

Флаконы без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии плесени или других примесей и не использованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Планшеты и контрольные сыворотки обеззараживают 3% раствором хлорамина. Остальные компоненты набора не требуют специальных мер утилизации.

ПРИМЕЧАНИЕ. Для проведения ИФА используют: одно- и многоканальные микропипетки переменных объемов со сменными наконечниками, мерную лабораторную посуду, дистиллированную или деионизованную воду, суховоздушный термостат с температурой 37^0С, спектрофотометр с вертикальным лучом света длиной волны 450 нм, липкую пленку.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

6. Метод основан на конкурентном взаимодействии конъюгированных с пероксидазой моноклональных антител к РСВ и сывороточных вирусспецифических антител с иммобилизованным на поверхности иммунологического планшета антигеном РСВ. При отсутствии в исследуемой сыворотке вирусспецифических антител, моноклональный конъюгат свободно взаимодействует с иммобилизованным антигеном и, после добавления субстрата с хромогеном, в лунке развивается окраска. Если исследуемая сыворотка содержит вирусспецифические антитела, происходит их взаимодействие с иммобилизованным антигеном РСВ, его частичная или полная блокировка. В результате чего связывание конъюгата с антигеном не происходит или происходит частично и, соответственно, окрашивание отсутствует или интенсивность окраски снижается. Таким образом, интенсивность окраски обратно пропорциональна количеству антител в исследуемой сыворотке.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

7. Подготовка к исследованиям

7.1. Подготовка биологического материала

Для анализа используют сыворотку крови крупного рогатого скота. Если анализ проводят в течение 24 ч после отбора проб, образцы биоматериала хранят при температуре 4^OС. При более длительном хранении образцы замораживают при температуре минус 20^OС. Перед исследованием замороженные образцы в течение 5-10 мин нагревают в водяной бане при температуре 37^OС.

В случае выпадения осадка в пробах их обязательно осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 2000g.

Не рекомендуется исследование проросших и гемолизированных проб, а также многократное замораживание и оттаивание образцов сыворотки крови.

7.2. Подготовка рабочих растворов

7.2.1. Перед началом работы все реагенты, кроме конъюгата, выдерживают не менее 30 мин при комнатной температуре (20-25^{0}С) и тщательно перемешивают.

ВНИМАНИЕ. При неоднократном использовании компонентов набора контрольные сыворотки рекомендуется расфасовать по 60-70 мкл в отдельные пробирки типа Эппендорф и хранить до следующего анализа при температуре минус 20°С.

Другие компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя.

7.2.2. Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов, разведения сывороток и конъюгата (**ФСБТ**). Содержимое флакона № 5 разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой. (Пример: для получения 500 мл рабочего раствора к 25 мл концентрата добавляют 475 мл воды). Следует иметь в виду, что для обработки одного стрипа требуется примерно 30 мл рабочего раствора. Рабочий раствор стабилен при температуре 4^{0}С в течение 3 сут. Для более длительного хранения раствор замораживают и хранят при температуре минус 20^0 С.

7.2.3. Рабочий раствор **конъюгата**. Концентрат конъюгата (флакон № 4) разводят в 100 раз рабочим раствором ФСБТ (п. 7.2.2.).

(Пример: для получения 11 мл рабочего раствора конъюгата (при использовании целого планшета) к 0,11 мл концентрата добавляют 10,9 мл рабочего раствора ФСБТ). Рабочий раствор конъюгата готовят непосредственно перед использованием.

7.2.4. Положительный (**К$^+$**, флакон № 2) и отрицательный (**К$^-$**, флакон № 3) контроли, субстратный раствор (**СР**, флакон № 6) и **стоп-раствор** (флакон № 7) - готовы к применению.

8. Проведение анализа

8.1. Для проведения скрининговых исследований контрольные пробы и испытуемые образцы сыворотки крови разводят 1:1 рабочим раствором ФСБТ, подготовленным по п. 7.2.2. (Пример: для получения 300 мкл образца для исследования к 150 мкл ФСБТ добавляют 150 мкл испытуемой пробы). Затем в лунки вносят по 50 мкл контрольных и испытуемых проб. Рекомендуется исследовать каждую пробу в двух повторах.

8.2. Для определения титра антител в индивидуальных сыворотках рекомендуется следующая схема внесения образцов. Во все лунки вертикальных рядов планшета (1, 2, 3, и т.д. - по количеству исследуемых образцов) вносят по 50 мкл рабочего раствора ФСБТ. В лунки ряда А (А1, А2, А3 и т.д.) вносят по 50 мкл исследуемых проб сыворотки и перемешивают. Делают дальнейшие двукратные разведения сыворотки последовательным перенесением по 50 мкл из лунок ряда А в лунки ряда В и т.д. до ряда Н. Из лунок ряда Н удаляют по 50 мкл раствора. Таким образом, диапазон титрования сыворотки от 1/2 до 1/256. Положительный и отрицательный контроли вносят только в разведении 1/2 в двух повторах.

Сразу после внесения в лунки образцов в каждую лунку с разведенной пробой вносят по 50 мкл рабочего раствора конъюгата (п.7.2.3.) и тщательно перемешивают. Закрывают планшет липкой пленкой и инкубируют 30 мин при температуре 37^{0}С.

8.3. Планшет 6 раз промывают рабочим раствором ФСБТ, подготовленным по п. 7.2.2., на автоматическом промывочном устройстве или вручную, каждый раз доверху заполняя лунки (300 мкл на лунку) и полностью удаляя жидкость постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

ВНИМАНИЕ. При этой операции возможно выпадение стрипов из рамки! Рекомендуется промаркировать стрипы для восстановления их первоначального расположения.

8.4. В каждую лунку вносят по 100 мкл субстратного раствора с хромогеном и инкубируют 10 минут при комнатной температуре.

8.5. Останавливают реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора.

8.6. После остановки реакции оптическую плотность субстратной смеси измеряют на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм ($\mathbf{A_{450}}$).

9. **Учет и интерпретация результатов**

9.1. Вычисляют среднее арифметическое значение $\mathbf{A_{450}}$ отрицательного ($\mathbf{A_{450}К^-}$), положительного ($\mathbf{A_{450}К^+}$) контролей и каждой опытной пробы ($\mathbf{A_{450}}$ОП), если пробу исследовали в двух повторах.

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

$$A_{450}К^{+} < 0,3$$

$$0,8 < A_{450}К^{-} < 1,5$$

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют. Если A_{450} отрицательного и положительного контролей соответствуют указанным значениям, проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

9.2. Вычисляют **cut off** (*отсекающее значение*), необходимое для правильной интерпретации результатов реакции:

$$\textbf{cut off} = A_{450}К^{-} - (A_{450}К^{-} - A_{450}К^{+}) \times 0,4$$

Пробы со значениями A_{450} выше Cut off считают отрицательными к PCB.

Пробы со значениями A_{450} ниже Cut off считают положительными к PCB.

Титром пробы считают последнее разведение, значение A_{450} которого ниже Cut Off.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

10. Работу с компонентами набора следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. При попадании их на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды

11. Запрещается прием пищи и воды, курение в помещении, где проводятся работы с компонентами набора.

12. Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим» совместно с фирмой INGENASA (Испания). Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16.

С утверждением настоящей инструкции утрачивает силу инструкция по применению набора для выявления антител к респираторно-синцитиальному вирусу крупного рогатого скота иммуноферментным методом «РСИ-СЕРОТЕСТ», утвержденная Россельхознадзором 09. 12. 2008 г.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ ВГНКИ
Регистрационный номер ПВР-1-7.8/02308