

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «Всероссийский  
государственный Центр качества и  
стандартизации лекарственных средств  
для животных и кормов»  
(ФГБУ «ВГНКИ»), председатель ТК 454

А.Н. Панин

« 9 » июля 20 13 г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора  
по качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.К. Старов

20 13 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для определения  
противоящурных антител в сыворотке крови  
животных в иммуноферментном анализе

(Организация-производитель: ФГБУ «ВНИИЗЖ»,  
г. Владимир, мкр. Юрьевец)

### I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для определения противоящурных антител в сыворотке крови в иммуноферментном анализе.

2. В состав набора входят иммуноспецифические и неспецифические компоненты:

#### **Иммуноспецифические компоненты:**

K1 – сенсibiliзирующие антитела к вирусу ящура (ВЯ), лиофилизированные или нативные, объем 0,5 см<sup>3</sup> – 1 флакон;

K2 - антиген ВЯ, лиофилизированный или нативный, объем 0,5 см<sup>3</sup> – 1 флакон;

K3 - детекторные антитела к ВЯ, лиофилизированные или нативные, объем 0,5 см<sup>3</sup> – 1 флакон;

K4 - контроль 1 (положительная сыворотка крови КРС к ВЯ), лиофилизированная или нативная, объем 0,2 см<sup>3</sup> – 1 флакон;

K5 - контроль 2 (слабоположительная сыворотка крови КРС к ВЯ), лиофилизированная или нативная, объем 0,2 см<sup>3</sup> – 1 флакон;

K6 - контроль 3 (нормальная сыворотка крови КРС, не содержащая антитела к вирусу ящура), лиофилизированная или нативная, объем 0,2 см<sup>3</sup> – 1 флакон;

K7 - иммунопероксидазный конъюгат против IgG морской свинки, лиофилизированный или нативный, объем 0,1 см<sup>3</sup> – 1 флакон (пробирка);

K8 – фетальная сыворотка КРС, лиофилизированная или нативная, объём 4,0 см<sup>3</sup> – 2 флакона.

**Неспецифические компоненты:**

K9 - соли для карбонатно-бикарбонатного буферного раствора, порошок в капсуле, масса 0,43 г – 1 флакон;

K10 - концентрат (20х) буферного раствора, жидкость, объём 100,0 см<sup>3</sup> - 1 флакон;

K11 – хромогенный субстрат АБТС (2,2'-азино-ди[3-этил]бензтиазолинсульфоновая кислота), жидкость, объём 25,0 см<sup>3</sup> - 1 флакон;

K12 - «стоп»-раствор - 2%-ный раствор додецилсульфата натрия, жидкость, объём 25,0 см<sup>3</sup> - 1 флакон.

Также в состав набора входят:

- полистироловые 96-луночные планшеты для иммуноферментного анализа – 4 шт.;

- полимерный планшет – 1 шт.

**3. Внешний вид:**

Антитела – в лиофилизированном виде - сухая пористая масса белого или светло-жёлтого цвета, в нативном виде – прозрачная жидкость бесцветная или светло-жёлтого цвета.

Антиген специфический – в лиофилизированном виде – сухая пористая масса белого или слабо-розового цвета, в нативном виде – прозрачная жидкость бесцветная или слабо-розового цвета.

Сыворотки - в лиофилизированном виде – сухая пористая масса светло-жёлтого или светло-коричневого цвета, в нативном виде – прозрачная жидкость жёлтого или светло-коричневого цвета.

Конъюгат – в лиофилизированном виде – сухая пористая масса белого цвета, в нативном виде – прозрачная жидкость бесцветная или светло-жёлтого цвета.

Соли для карбонатно-бикарбонатного буферного раствора – порошок белого цвета в капсуле.

Концентрат буферного раствора – прозрачная бесцветная жидкость.

Хромогенный субстрат АБТС - прозрачная жидкость светло-зелёного цвета.

«Стоп–раствор» - прозрачная бесцветная жидкость. Допускается выпадение белого хлопьевидного осадка, исчезающего при нагревании до комнатной температуры.

4. Компоненты набора расфасованы в стеклянные флаконы, укупоренные пробками, укрепленные алюминиевыми колпачками или в полимерные флаконы соответствующей вместимости с завинчивающимися крышками, или пробирки типа «эппендорф».

На флаконы (пробирки) с компонентами наклеивают этикетку с указанием: организации-производителя; ее товарного знака, названия компонента, порядкового номера компонента, объема во флаконе (пробирке), номера серии, типа вируса ящура (для вирусоспецифических компонентов), срока годности, рабочего разведения (для сенсibiliзирующих антител, антигена ВЯ, детекторных антител и конъюгата), рекомендации по приготовлению (для карбонатно-бикарбонатного буферного раствора).

Компоненты набора упакованы в картонные или пенополистирольные коробки с наличием гнезд или перегородок, обеспечивающие их целостность. На каждую коробку с набором наклеивают этикетку с указанием: названия организации-производителя, её адреса и товарного знака, названия набора, типа ВЯ, перечня компонентов, номера серии, даты изготовления (месяц, год), срока годности (месяц, год), условий хранения, обозначения СТО, знака соответствия, штрих-кода и надписи "Для ветеринарного применения".

5. Набор рассчитан на исследование 168 проб сыворотки крови животных в двух повторностях.

Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения исследований по мере поступления биологического материала при соблюдении условий подготовки и хранения (по п.п. 11 - 12).

6. Срок годности набора 12 месяцев от даты изготовления при условии хранения и транспортирования набора в сухом защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C. Запрещено смешивать компоненты наборов разных серий и использовать по истечении срока годности.

7. При нарушении целостности и укупорки флаконов, изменении цвета компонентов, наличии плесени и посторонних примесей во флаконах, плохой растворимости, при отсутствии этикеток, а также в случае не использования в пределах срока годности, иммуноспецифические компоненты выбраковывают и обеззараживают кипячением в течение 15 минут с последующей утилизацией.

Утилизация неспецифических компонентов набора не требует специальных мер безопасности.

## II. ПРИНЦИП МЕТОДА

8. Выявление вирусоспецифических антител проводят в жидкофазном блокирующем варианте ИФА. Метод основан на специфическом блокировании антигена ВЯ антителами, содержащимися в исследуемой пробе сыворотки в жидкой фазе. Затем смесь «исследуемая сыворотка/антиген» переносится в лунки планшета, предварительно сенсibilизированного улавливающими антителами. Наличие антител к ВЯ в исследуемой пробе будет выражаться в образовании иммунного комплекса и уменьшении количества свободного антигена, который связывается иммобилизованными на планшете улавливающими антителами. Фиксированный в лунках антиген взаимодействует с детекторными антителами, которые выявляются в реакции с иммунопероксидазным конъюгатом против IgG морской свинки и последующим окрашиванием с помощью хромогенного субстрата АБТС. Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе. Интенсивность цветной реакции учитывают визуально или с помощью спектрофотометра.

## III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

9. Набор предназначен для выявления противоящурных антител в сыворотках крови животных в иммуноферментном анализе. Каждый набор рассчитан на определение антител к вирусу одного типа, указанному на этикетке коробки с набором.

### 10. Подготовка к исследованию

10.1 Материалом для исследования служат индивидуальные пробы сыворотки крови животных без признаков гемолиза и бактериальной контаминации, объёмом не менее 0,5 см<sup>3</sup>.

Допускается хранение образцов сыворотки при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 24 часов после отбора проб, при более длительном хранении, месяц и более, образцы замораживают при температуре минус 20 °С. Перед исследованием образцы сыворотки крови оттаивают при комнатной температуре или в водяной бане при температуре (37,0±0,5) °С. Не рекомендуется многократное замораживание и оттаивание образцов.

### 10.2 Оборудование и материалы:

- пипетки одно- и восьмиканальные автоматические переменного объема до 0,02 см<sup>3</sup>, до 0,2 см<sup>3</sup> и до 1,0 см<sup>3</sup> со сменными наконечниками;
- посуда мерная лабораторная;

- микропробирки для разведения образцов, вместимостью 0,5 – 1,0 см<sup>3</sup>;
- вода дистиллированная;
- термостат с поддержанием температуры (37,0±0,5)°С;
- холодильник бытовой;
- рН-метр;
- микропланшетный вошер (желательно);
- спектрофотометр (ридер) с вертикальным лучом света при длине волны 405 нм - для учета результатов ИФА.

**Перед началом работы набор с компонентами выдерживают 30 мин при температуре от 18°С до 20°С.**

#### 11. Подготовка лиофилизированных компонентов набора

11.1. Перед началом работы лиофилизированные препараты К1-К8 восстанавливают до объёма, указанного на этикетке, для чего к содержимому флаконов добавляют необходимое количество дистиллированной воды.

Подготовленные препараты рекомендуется хранить при температуре минус (10±1)°С и ниже не более одного месяца. В течение срока годности размораживание допускается один-два раза.

Препараты в нативном виде готовы к использованию, хранятся при температуре от 2°С до 8°С в течение всего срока хранения набора.

#### 12. Приготовление рабочих растворов

**12.1. Раствор №1.** Карбонатно-бикарбонатный буферный раствор, рН 9,6, для сенсibilизации планшетов. Содержимое капсулы (флакон К9) растворяют в 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2°С до 8°С не более одного месяца.

**12.2. Раствор №2.** Раствор используется для приготовления рабочего раствора для межэтапной промывки планшетов и подготовки проб для исследования, а так же как основа для приготовления рабочего буферного раствора для разведения детекторных антител и иммунопероксидазного конъюгата. Для чего содержимое флакона с концентратом (20х) буферного раствора (К10) переливают в мерную посуду, добавляют дистиллированную воду до 2000 см<sup>3</sup> и тщательно перемешивают.

Значение рН раствора №2 должно быть в пределах 7,4-7,6.

Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2°С до 8°С не более одного месяца.

**12.3. Раствор №3.** Рабочий буферный раствор для разведения детекторных антител и иммунопероксидазного конъюгата готовится из раствора №2 с добавлением 10% фетальной сыворотки КРС. Для этого к 36 см<sup>3</sup> раствора №2 следует добавить 4,0 см<sup>3</sup> фетальной сыворотки КРС, восстановленной из лиофилизированного препарата К8 путем добавления к содержимому флакона с сывороткой 4,0 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

Значение pH буферного раствора №3 должно быть в пределах 7,4-7,6.

Готовится непосредственно перед использованием, при необходимости допускается хранение раствора при температуре от 2°C до 8°C не более суток или при температуре минус 20°C. Замораживание и оттаивание не влияет на качество раствора.

**12.4. Раствор №4.** Раствор субстратно-индикаторной смеси (хромогенный субстрат АБТС), К11, готов к употреблению, рекомендуется хранение при температуре от 2°C до 8°C во флаконе из темного пластика.

#### **12.5. Раствор №5.** «Стоп»-раствор

Раствор, останавливающий реакцию окрашивания (К12), готов к использованию, рекомендуется хранение при температуре от 2°C до 8°C. Возможно выпадение осадка, который растворяется при нагревании до комнатной температуры, что не влияет на качество реагента.

13. Постановка реакции ИФА для выявления противоящурных антител в сыворотках крови животных

#### **13.1 Сенсibilизация планшетов**

Раствор сенсibilизирующих антител готовят в разведении, указанном на флаконе К1, в растворе №1 (карбонатно-бикарбонатный буферный раствор).

Например, при указанном разведении сенсibilизирующих антител 1:100, 0,11 см<sup>3</sup>, или 110 мкл, восстановленного концентрата добавляют в 11,0 см<sup>3</sup> раствора №1.

Во все лунки планшета вносят по 0,1 см<sup>3</sup> (100 мкл) раствора сенсibilизирующих антител, накрывают крышкой и инкубируют в течение 18 часов при температуре (4±2)°C.

#### **13.2 Промывание лунок планшета**

Промывание производят с использованием автоматических устройств либо вручную. Содержимое лунок планшета удаляют, затем заполняют лунки раствором №2 и удаляют интенсивным встряхиванием. Процедуру повторяют два раза.

### 13.3 Реакция в жидкой фазе

Параллельно с сенсibilизацией планшета (п.13.1) проводят реакцию антигена с испытуемыми и контрольными пробами сыворотки крови. Готовят разведения проб 1:32 в растворе №2 в двух повторностях. Для чего во все лунки полимерного планшета за исключением лунок А1, В1, С1, D1, G12 и H12, которые оставляют для контроля антигена (КА) и контроля конъюгата (КК), вносят по 0,047см<sup>3</sup> (47 мкл) буферного раствора и 0,003 см<sup>3</sup> (3 мкл) пробы. В лунки А1, В1, С1, D1, G12 и H12 вносят по 0,05 см<sup>3</sup> (50 мкл) буферного раствора. Испытуемые и контрольные пробы располагают на планшете согласно схеме в таблице 1.

В качестве контроля 1 используют положительную сыворотку крови КРС к ВЯ (К4), контроля 2 - слабopоложительную сыворотку крови КРС к ВЯ (К5), контроля 3 – нормальную сыворотку КРС (К6).

Затем во все лунки планшета добавляют по 0,05 см<sup>3</sup> (50 мкл) рабочего разведения антигена в растворе №2 в соответствии с разведением, указанным на этикетке. После перемешивания содержимого лунок планшета при помощи шейкера или лёгким встряхиванием вручную планшет закрывают крышкой и инкубируют в течение 18 часов при температуре (4±2)°С.

Таблица 1

#### Схема расположения на планшете тестируемых и контрольных проб сыворотки при постановке ИФА

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>КА</b>	проба 3	проба 7	проба 11	проба 15	проба 19	проба 23	проба 27	проба 31	проба 35	проба 39	контроль 1
<b>B</b>	<b>КА</b>	проба 3	проба 7	проба 11	проба 15	проба 19	проба 23	проба 27	проба 31	проба 35	проба 39	контроль 1
<b>C</b>	<b>КК</b>	проба 4	проба 8	проба 12	проба 16	проба 20	проба 24	проба 28	проба 32	проба 36	проба 40	контроль 2
<b>D</b>	<b>КК</b>	проба 4	проба 8	проба 12	проба 16	проба 20	проба 24	проба 28	проба 32	проба 36	проба 40	контроль 2
<b>E</b>	проба 1	проба 5	проба 9	проба 13	проба 17	проба 21	проба 25	проба 29	проба 33	проба 37	проба 41	контроль 3
<b>F</b>	проба 1	проба 5	проба 9	проба 13	проба 17	проба 21	проба 25	проба 29	проба 33	проба 37	проба 41	контроль 3
<b>G</b>	проба 2	проба 6	проба 10	проба 14	проба 18	проба 22	проба 26	проба 30	проба 34	проба 38	проба 42	<b>КА</b>
<b>H</b>	проба 2	проба 6	проба 10	проба 14	проба 18	проба 22	проба 26	проба 30	проба 34	проба 38	проба 42	<b>КА</b>

### 13.4 Улавливание антигена

В промытые лунки сенсibilизированного планшета (п.п. 13.1, 13.2) вносят по 0,05 см<sup>3</sup> (50 мкл) смеси контрольных и испытуемых проб и антигена (п.13.3), планшет закрывают крышкой и инкубируют в течение 1 часа при температуре (37,0±0,5)°С.

### *13.5 Промывание лунок планшета*

Проводят по п. 13.2, процедуру повторяют 4 раза.

### *13.6 Внесение детекторных антител*

Во все лунки планшета, за исключением лунок С1 и D1 с КК, куда добавляют по 0,05 см<sup>3</sup> (50 мкл) раствора №3, вносят по 0,05 см<sup>3</sup> (50 мкл) рабочего разведения детекторных антител в растворе №3 в соответствии с разведением, указанным на этикетке флакона К3, планшет закрывают крышкой и инкубируют в течение 1 часа при температуре (37,0±0,5)°С.

### *13.7 Промывание лунок планшета*

Проводят по п. 13.2, процедуру повторяют 4 раза.

### *13.8 Внесение конъюгата*

Во все лунки планшета вносят по 0,05 см<sup>3</sup> (50 мкл) рабочего разведения конъюгата в растворе №3 в соответствии с разведением, указанным на этикетке флакона К7, планшет закрывают крышкой и инкубируют в течение 1 часа при температуре (37,0±0,5)°С.

### *13.9 Промывание лунок планшета*

Проводят по п. 13.2, процедуру повторяют 4 раза.

### *13.10 Окрашивание*

Во все лунки планшета вносят по 0,05 см<sup>3</sup> (50 мкл) хромогенного субстрата АБТС, закрывают крышкой и выдерживают 15-20 мин при температуре 20-25°С.

### *13.11 Остановка реакции*

Реакцию останавливают добавлением в каждую лунку планшета 0,05 см<sup>3</sup> (50 мкл) «стоп»-раствора.

## **14 Учет результатов ИФА**

14.1 Результаты анализа учитывают инструментальным способом. Сразу после остановки реакции измеряют оптическую плотность (ОП) продуктов реакции в каждой лунке при длине волны 405 нм, используя спектрофотометр (ридер) для микропланшетов с вертикальным лучом света. Значения ОП контрольных и исследуемых проб переводят в значение процента ингибиции (PI) по формуле:

$$PI = \left(1 - \frac{ОП_{пробы} - ОП_{КК}}{ОП_{КА} - ОП_{КК}}\right) \times 100\%$$

где ОП<sub>пробы</sub> – среднее значение оптической плотности смеси исследуемой или контрольной пробы с антигеном ВЯ; ОП<sub>КА</sub> – среднее значение оптической плотности контроля антигена; ОП<sub>КК</sub> – среднее значение оптической плотности контроля конъюгата.

Реакция считается достоверной, если удовлетворяет следующим критериям:



- разница между значениями ОП КА и КК не менее 0,4 о.е.;
- контроль 1 имеет значение PI>75%;
- контроль 2 имеет значение PI в пределах 50-75%;
- контроль 3 имеет значение PI<50%;

Пробы, демонстрирующие значение PI  $\geq$  50%, считают положительными, а животные, от которых получены данные пробы сыворотки крови иммунными к ВЯ.

#### IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

15. При работе с набором следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными средствами ветеринарного назначения.

16. Все лица, участвующие в проведении испытаний, должны быть одеты в спецодежду (халат, брюки, головной убор, резиновые перчатки) и обеспечены индивидуальными средствами защиты. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

17. При попадании компонентов набора на кожу и/или слизистые оболочки их рекомендуется промыть большим количеством водопроводной воды.

18. Организация-производитель: федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), 600901, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевец.

Инструкция по применению «Набора для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в иммуноферментном анализе» разработана ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевец.

С утверждением настоящей инструкции утрачивает силу инструкция по применению «Набора для определения противоящурных антител в сыворотках крови животных в иммуноферментном анализе», утвержденная заместителем Руководителя Россельхознадзора от 16 сентября 2009 г.