



УТВЕРЖДАЮ

Директор
ФКП «Курская биофабрика»

В.М. Безгин

2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению
набора для выявления и дифференциации антител к S- и R-формам
возбудителей бруцеллёза иммуноферментным методом

(Организация-разработчик: Федеральное казенное предприятие «Курская биофабрика – фирма «БИОК»
(ФКП «Курская биофабрика»), г. Курск)

I ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1 Набор для выявления и дифференциации антител к S- и R-формам возбудителей бруцеллёза в сыворотке крови животных иммуноферментным методом.

2 В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

- **компонент № 1** – полистироловый 96-луночный цельный или стрипованный планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированными в лунках антигенами *Brucella spp* в S-форме (нечётные ряды) и R-форме (чётные ряды) – 2 планшета;

- **компонент № 2** – анти-*Brucella spp* S-специфическая сыворотка крови (положительный S-контроль), прозрачная жидкость жёлтого или красноватого цвета, 0,2 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 3** – анти-*Brucella spp* R-специфическая сыворотка крови (положительный R-контроль), прозрачная жидкость жёлтого или красноватого цвета, 0,2 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 4** – сыворотка крови, не содержащая антител к *Brucella spp* (отрицательный контроль), прозрачная жидкость жёлтого или красноватого цвета, 0,2 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 5** – конъюгат (моноклональные антитела к антигенам *Brucella spp* в S- и R-формах, меченные пероксидазой), концентрированный, прозрачная окрашенная жидкость, 1,0 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 6** – концентрат (х 20) промывочного буферного раствора, прозрачная бесцветная жидкость, 20,0 см³ – 2 флакона;

- **компонент № 7** – концентрат (х 20) буферного раствора для разведения конъюгата, жидкость красного цвета, 5,0 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 8** – раствор субстрата (H₂O₂), прозрачная бесцветная жидкость, 22,0 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 9** – раствор хромогена (ТМБ), прозрачная бесцветная жидкость, 0,6 см³ – 1 флакон;

- **компонент № 10** – останавливающий раствор (1 М раствор фосфорной кислоты), прозрачная бесцветная жидкость, 20,0 см³ – 1 флакон.

3 Компонент № 1 (96-луночный планшет) упакован в индивидуальный полиэтиленовый пакет с влагопоглотителем. Остальные компоненты набора расфасованы во флаконы из непрозрачного полиэтилена соответствующей вместимости, с закрывающимися пробками.

На флаконы (пакеты) с компонентами нанесена следующая маркировка: наименование организации-производителя и ее товарный знак; название и номер компонента, объем во флаконе (см³); номер серии и дата выпуска (месяц, год); срок годности; условия хранения. На флаконе с компонентом № 5 указано рабочее разведение.

Компоненты набора упакованы в картонные коробки, обеспечивающие их целостность. На картонные коробки нанесена маркировка с указанием наименования, адреса, телефона и товарного знака организации-производителя; наименования набора; номера серии; перечня и количества компонентов набора; даты выпуска (месяц, год); срока годности (месяц, год); количества проб; условий хранения; надписи «Для ветеринарного применения». В каждую коробку вложена инструкция по применению набора.

4 Набор рассчитан на анализ 45 проб сывороток крови на каждой планшете при единовременном использовании. Компонировка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения исследований в разное время по мере поступления биологического материала.

5 Срок годности компонентов набора – 12 месяцев от даты изготовления при условии хранения и транспортирования набора в защищённом от света месте и температуре от 2 °С до 8 °С. Набор после вскрытия можно использовать в течение 30 суток при соблюдении условий хранения. Запрещено смешивать компоненты наборов разных серий и использовать наборы по истечении срока годности. **Не допускается замораживание компонентов!**

6 При нарушении целостности и укупорки флаконов, упаковки полистироловых планшетов и пакетов, изменении цвета компонентов, наличии посторонней примеси, при отсутствии этикеток, а также по истечении срока годности набор выбраковывают, иммуноспецифические компоненты обеззараживают кипячением в течение 15 мин. Неиспользованные планшеты дезинфицируют в 3 % растворе хлорамина и утилизируют. Утилизация неспецифических компонентов наборов не требует специальных мер безопасности.

II ПРИНЦИП МЕТОДА

7 Метод основан на конкурентном взаимодействии конъюгата (моноклональных антител к антигенам *Brucella spp* в S- и R-формах, меченных пероксидазой) и бруцеллёзных антител, присутствующих в сыворотке крови исследуемого животного, за связывание с антигенами *Brucella spp*, адсорбированными на поверхности лунок планшета с использованием моноклональных антител: в нечётных рядах – антиген в S-форме, в чётных рядах – антиген в R-форме. Каждую пробу сыворотки вносят в две лунки планшета: одну – в нечётном ряду и одну в чётном ряду.

При отсутствии в исследуемой сыворотке крови бруцеллёзных антител конъюгат свободно взаимодействует и полностью связывается с адсорбированным на поверхности лунки антигеном *Brucella spp*, формируя иммунный комплекс. Последний выявляется в процессе выполнения последовательных этапов конкурентного варианта иммуноферментного анализа (ИФА), включающих его взаимодействие с субстратной смесью и останавливающим раствором, в результате чего в лунке планшета развивается окраска.

Если образец исследуемой сыворотки содержит бруцеллёзные антитела, то они, взаимодействуя с адсорбированным на поверхности лунок антигеном *Brucella spp* в S- или R-форме, частично или полностью блокируют связывание конъюгата с антигеном, соответственно, интенсивность окраски снижается или окрашивание в лунке отсутствует. Таким образом, интенсивность окраски реакционной смеси в лунке обратно пропорциональна концентрации антител в исследуемой сыворотке крови. Используя результаты реакций, полученные с контрольными сыворотками, можно определить присутствие S-, R- или SR-бруцеллёзных антител в исследуемом образце.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

Набор предназначен для диагностики бруцеллёза:

- крупного рогатого скота, не иммунизированного против бруцеллёза, иммунизированного неагглютиногенными бруцеллёзными вакцинами (из штамма *B. abortus* KB 17/100 или аналогичной) или слабоагглютиногенными бруцеллёзными вакцинами (из штаммов *B. abortus* 82, 75/79-AB или аналогичными), но не ранее чем через 6 месяцев после введения вакцины;

- мелкого рогатого скота, свиней и собак, не вакцинированных против бруцеллёза.

8 Подготовка к исследованию

8.1 Для исследования используют сыворотки крови животных без признаков гемолиза и бактериальной контаминации, объёмом не менее $0,5 \text{ см}^3$. Допускается хранение образцов при температуре от 2°C до 8°C в течение 72 ч или при температуре не выше минус 20°C в течение 60 суток после их получения. Размораживать образцы сыворотки крови необходимо в водяной бане при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Не рекомендуется многократное замораживание и оттаивание образцов.

8.2 Для проведения ИФА требуются одно- и восьмиканальные пипетки переменного объёма до $0,01$; $0,20$; $1,0$; $5,0$ и $10,0 \text{ см}^3$ со сменными наконечниками, мерная лабораторная посуда, термостат с температурой нагрева $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, дистиллированная вода, бытовой холодильник, фильтровальная бумага, контейнер, система промывания планшетов, которая распределяет по $0,3 \text{ см}^3$ раствора в лунку, спектрофотометр (ридер) для микропланшетов любой модели с фильтром на 450 нм для учёта результатов ИФА.

8.3 Перед началом работы набор выдерживают 25 мин – 30 мин при комнатной температуре от 18°C до 22°C . Сразу после проведения анализа неиспользованные компоненты убирают в холодильник с температурой от 2°C до 8°C .

8.4 Перед началом работы составляют план проведения исследования.

9 Приготовление рабочих растворов

9.1 Промывочный буферный рабочий раствор. Компонент № 6 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают (например, для получения 200 см^3 промывочного буферного рабочего раствора к 10 см^3 концентрата добавляют 190 см^3 дистиллированной воды).

9.2 Буферный рабочий раствор для разведения конъюгата. Компонент № 7 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают (например, для получения 50 см^3 буферного раствора к $2,5 \text{ см}^3$ концентрата добавляют $47,5 \text{ см}^3$ дистиллированной воды). После разведения буферный рабочий раствор можно хранить при температуре от 2°C до 8°C в течение 5 суток.

9.3 Рабочий раствор конъюгата. Компонент № 5 разбавляют буферным рабочим раствором для разведения конъюгата согласно концентрации, указанной на этикетке. Например, имея 40-кратный концентрат, в расчёте на один планшет, к $0,25 \text{ см}^3$ компонента № 5 добавляют $10,0 \text{ см}^3$ буферного рабочего раствора. Рабочий раствор конъюгата хранить нельзя.

9.4 Субстратная смесь. **Субстратную смесь изготавливают после завершения промывания лунок.** Для приготовления 10 см^3 раствора субстратной смеси, необходимых для проведения реакции на одном планшете, смешивают $10,0 \text{ см}^3$ раствора компонента № 8 и $0,25 \text{ см}^3$ раствора компонента № 9. Подготовленный раствор субстратной смеси должен быть бесцветным и стабильным в течение 15 мин. Раствор субстратной смеси с изменённым цветом не используют.

9.5 Компонент набора № 10 (останавливающий раствор) не требует предварительной подготовки.

10 Постановка реакции

10.1 Наслаивание сывороток. Сыворотки крови животных исследуют в разведении 1:10 в рабочем растворе конъюгата моноклональных антител непосредственно в лунках планшета.

10.1.1 Из комплекта набора берут пакет с компонентом № 1 (полистироловым 96-луночным планшетом для иммуноферментного анализа с адсорбированными в лунках антигенами *Brucella spp* в S-форме (нечётные ряды) и R-форме (чётные ряды)). При необходимости отбирают требуемое количество стрипов, помещают в рамку-держатель и маркируют водостойким маркером из-за возможного выпадения их из рамки во время проведения исследования. Неиспользованные стрипы помещают в пакет с влагопоглотителем и хранят в холодильнике при температуре от 2°C до 8°C . Неиспользуемые лунки цельного планшета можно сохранить для дальнейшего использования, если немедленно заклеить их герметичной водонепроницаемой плёнкой. Компонент № 1 (планшет) используют однократно.

10.1.2 В лунки полистиролового планшета в соответствии с подготовленным планом исследования вносят по $0,09 \text{ см}^3$ рабочего раствора конъюгата, подготовленного по 9.3, и

непосредственно после этого в лунки добавляют по $0,01 \text{ см}^3$ образцов контрольных и исследуемых сывороток:

- в лунки A1 и A2 – компонента № 2 (положительного S-контроля);
- в лунки B1 и B2 – компонента № 3 (положительного R-контроля);
- в лунки C1 и C2 – компонента № 4 (отрицательного контроля);
- в лунки D1 и D2 – испытуемой пробы сыворотки крови № 1;
- в лунки E1 и E2 – испытуемой пробы сыворотки крови № 2;
- в лунки F1 и F2 – испытуемой пробы сыворотки крови № 3 и т.д.

Для внесения каждого образца используют новый наконечник.

После внесения сывороток крови аккуратно перемешивают содержимое лунок встряхиванием на шейкере или вручную осторожным вращением планшета в горизонтальной плоскости в течение 1 – 2 мин, не допуская разбрызгивания содержимого лунок.

10.2 Планшет накрывают крышкой и инкубируют 1 ч (± 5 мин) при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. **ВНИМАНИЕ: необходимо точно соблюдать время инкубации планшета.**

10.3 Промывание лунок планшетов

Содержимое лунок планшета удаляют, используя автоматические или ручные промывающие системы, в крайнем случае, допускается встряхивание. Все лунки планшета промывают 4 раза рабочим промывочным буферным рабочим раствором, подготовленным по 9.1 (по $0,3 \text{ см}^3$ в каждую лунку), затем раствор удаляют. Во время обработки большого количества планшетов (с целью синхронизации этапов) можно оставлять планшеты с промывочным буферным рабочим раствором до 20 мин.

После последнего промывания необходимо осторожно постучать планшетом по впитывающему материалу (фильтровальной бумаге) с целью полного удаления содержимого лунок.

10.4 Обнаружение (внесение субстратного раствора)

В каждую лунку планшета вносят по $0,1 \text{ см}^3$ субстратного раствора, подготовленного по 9.4. Планшет накрывают крышкой и инкубируют при температуре от $18 ^\circ\text{C}$ до $24 ^\circ\text{C}$ в защищённом от прямых солнечных лучей месте от 1 мин до 10 мин до достижения ярко выраженного синего окрашивания в лунках с компонентом № 4 (отрицательным контролем).

10.5 Остановка реакции

В каждую используемую лунку планшета вносят по $0,08 \text{ см}^3$ компонента № 10 (останавливающего раствора). Не допускается контакт наконечника, содержащего останавливающий раствор, с содержимым лунки, так как перенос окрашенного раствора из лунки в лунку или резервуар с раствором может исказить результаты. Тщательно вытирают наружную нижнюю поверхность планшета.

10.6 Учёт реакции

Результаты анализа учитывают инструментальным способом. Сразу после остановки реакции измеряют оптическую плотность (ОП) продуктов реакции в каждой лунке, используя спектрофотометр (ридер) для микропланшетов с вертикальным лучом света при длине волны 450 нм. Перед проведением измерений устанавливают «0» фотометра по воздуху.

11 Оценка результатов реакции

11.1 Оценивают величины оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами №№ 2 – 4 (контрольными сыворотками крови).

Результаты считают достоверными, если:

- величина оптической плотности, полученная в реакции с компонентом № 2 в лунке нечётного ряда, не менее чем в 2 раза меньше величины оптической плотности, полученной в реакции с компонентом № 3 в лунке нечётного ряда;
- величина оптической плотности, полученная в реакции с компонентом № 3 в лунке чётного ряда, не менее чем в 2 раза меньше величины оптической плотности, полученной в реакции с компонентом № 2 в лунке чётного ряда;
- величины оптической плотности, полученные в реакциях с компонентом № 4 в лунках нечётного и чётного рядов, превышают величины оптической плотности, полученные в реакциях с компонентом № 2 в лунке нечётного ряда и с компонентом № 3 в лунке чётного ряда.

11.2 Если величины оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами №№ 2 – 4, не соответствуют указанным критериям, результаты считаются недостоверными и исследование проводят повторно.

11.3 Если величины оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами №№ 2 – 4, соответствуют вышеуказанным критериям, то проводят оценку результатов реакций в лунках с исследуемыми образцами сывороток.

11.4 Определяют пороговое значение оптической плотности (K_S или K_R) наличия специфических антител к S- и R-антигенам по формулам:

$$K_S = \frac{\text{ОП Компонент № 4}_{\text{нечётного ряда}}}{1,5} \quad (\text{для S-антигена})$$

$$K_R = \frac{\text{ОП Компонент № 4}_{\text{чётного ряда}}}{1,5} \quad (\text{для R-антигена})$$

11.5 При значении величины оптической плотности в лунке нечётного ряда меньшем значения величины K_S исследуемый образец сыворотки считают содержащим антитела к S-форме бруцеллёзного антигена и реакцию оценивают как положительную.

11.6 При значении величины оптической плотности в лунке чётного ряда меньшем значения величины K_R исследуемый образец сыворотки считают содержащим антитела к R-форме бруцеллёзного антигена и реакцию оценивают как положительную.

11.7 При значении величин оптической плотности в лунках нечётного и четного рядов меньшем значений величин K_S и K_R исследуемый образец сыворотки считают содержащим антитела к S- и R-формам бруцеллёзного антигена и реакции оценивают как положительные.

11.8 При значениях величин оптической плотности в лунках нечётного и чётного рядов равном или большем значений величин K_S и K_R исследуемый образец сыворотки считают не содержащим бруцеллёзных антител и реакции оценивают как отрицательные.

12 Диагностическая оценка результатов

12.1 Крупный рогатый скот

12.1.1. В благополучных и неблагополучных по бруцеллёзу стадах крупного рогатого скота:

- животных, не иммунизированных против бруцеллёза или иммунизированных неагглютиногенными вакцинами, при положительном результате реакции с S-бруцеллёзным или одновременно с S- и R-бруцеллёзными антигенами считают больными бруцеллёзом;

- животных, не иммунизированных против бруцеллёза, при положительном результате реакции с R-бруцеллёзным антигеном исследуют на бруцеллёз повторно через 30 суток. В случае получения при повторном исследовании положительного результата в реакции с R-бруцеллёзным антигеном, заболевание животных исключают путём проведения одновременного серологического и молекулярно-генетического исследований через 15-30 суток после предыдущего тестирования.

12.1.2. В благополучных по бруцеллёзу стадах крупного рогатого скота:

- животных, исследованных не ранее чем через 6 месяцев после иммунизации слабоагглютиногенными бруцеллёзными вакцинами, при положительном результате реакции с S- или одновременно с S- и R- бруцеллёзными антигенами, исследуют на бруцеллёз повторно через 30 суток.

В случае получения при повторном исследовании положительного результата в реакции с S-бруцеллёзным антигеном при увеличении разницы между величиной показателя оптической плотности в лунках с тестируемыми сыворотками и K_S , животных считают больными бруцеллёзом независимо от результатов реакции с R-бруцеллёзным антигеном.

В случае получения при повторном исследовании положительного результата в реакции с S-бруцеллёзным антигеном при той же величине или снижении разницы между величиной показателя оптической плотности в лунках с тестируемыми сыворотками и K_S , заболевание животных бруцеллёзом исключают независимо от результатов реакции с R-бруцеллёзным антигеном.

В случае получения при повторном исследовании отрицательных результатов, или при положительных результатах реакции только с R-бруцеллёзным антигеном заболевание животных бруцеллёзом исключают.

12.1.3. В неблагополучных по бруцеллёзу стадах крупного рогатого скота:

- животных, исследованных не ранее чем через 6 месяцев после иммунизации слабоагглютиногенными бруцеллёзными вакцинами, при положительной реакции с S- или одновременно с S- и R-бруцеллёзными антигенами, исследуют на бруцеллёз повторно через 30 суток.

В случае получения при повторном исследовании положительного результата в реакции с S-бруцеллёзным антигеном при той же величине или увеличении разницы между показателем величины оптической плотности в лунках с тестируемыми сыворотками и K_S , животных считают больными бруцеллёзом независимо от результатов реакции с R-бруцеллёзным антигеном.

В случае получения при повторном исследовании отрицательных результатов или при снижении разницы между показателями величины оптической плотности в лунках с S-бруцеллёзным антигеном и K_S , заболевание животных бруцеллёзом исключают.

При получении положительного результата только с бруцеллёзным антигеном в R-форме, заболевание животных бруцеллёзом исключают.

12.2 Мелкий рогатый скот, свиньи, собаки, не вакцинированные против бруцеллёза:

- животных, при положительном результате реакции с S-бруцеллёзным или одновременно с S- и R-бруцеллёзными антигенами считают больными бруцеллёзом;

- мелкий рогатый скот, при положительном результате реакции с R-бруцеллёзным антигеном исследуют повторно через 30 суток. В случае получения при повторном исследовании положительного результата в реакции с R-бруцеллёзным антигеном, заболевание животных исключает путём проведения одновременно ИФА, серологического исследования с овисными диагностикумами и молекулярно-генетического исследования через 15-30 суток после предыдущего тестирования;

- свиней, при положительном результате реакции с R-бруцеллёзным антигеном исследуют повторно через 30 суток. В случае получения при повторном исследовании положительного результата в реакции с R-бруцеллёзным антигеном, заболевание животных исключает путём проведения одновременно ИФА и молекулярно-генетического исследования через 15-30 суток после предыдущего тестирования;

- собак, при положительном результате реакции с R-бруцеллёзным антигеном считают больными бруцеллёзом, вызванным *B. canis*.

12.3 Животных, в отношении которых требуется проведение повторного исследования, до получения результатов, исключающих диагноз на бруцеллёз, содержат изолированно.

IV МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

12 Меры личной профилактики при проведении диагностических исследований с использованием набора сводятся к соблюдению санитарно-эпидемиологических правил и техники безопасности при работе с биологическим материалом.

13 В случае попадания компонентов набора и исследуемого материала на открытые участки тела или слизистые оболочки, их смывают большим количеством водопроводной воды с мылом.

14 Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Организация – производитель – ФКП «Курская биофабрика» (305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5).

Адрес места производства ФКП «Курская биофабрика» (305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5).

Наименование и адрес организации, уполномоченной на принятие претензий от потребителя: ФКП «Курская биофабрика», 305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5.