



УТВЕРЖДАЮ:

ООО «Имген+»

А.В.Таранин

"\_\_ марта \_\_2017г.

## НАСТАВЛЕНИЕ

по применению тест-системы для диагностики алеутской болезни норок в реакции иммуноосмоэлектрофореза (РИОЭФ)

### 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Тест-система предназначена для выявления животных, инфицированных вирусом алеутской болезни норок. Основным свойством тест-системы является способность выявлять специфические антитела к вирусу алеутской болезни в пробах сыворотки крови.

1.2. Тест-система представляет собой набор компонентов, основой которого является рекомбинантный белок оболочки вируса алеутской болезни норок штамма "ADVG".

1.3. Набор рассчитан на исследование 2400 неизвестных, 50 контрольных положительных и 50 контрольных отрицательных образцов.

### 2. СОСТАВ НАБОРА И ФОРМА ВЫПУСКА.

Набор включает следующие компоненты:

1. **Антиген** – жидкость от синего до темно-фиолетового цвета – 25 мл во флаконе;
2. Положительная контрольная сыворотка (**+Контроль**) – жидкость от бледно-желтого до красно-коричневого цвета - 0,6 мл в пластиковой пробирке;
3. Отрицательная контрольная сыворотка (**- Контроль**) – жидкость от бледно-желтого до красно-коричневого цвета - 0,4мл в пластиковой пробирке;.
4. Буферная смесь (**Буфер**) – порошок от белого до бледно-желтого цвета - 14,1 г в пакете с защелкивающимся краем;
5. **Агароза** - порошок от белого до бледно-желтого цвета – одной навеской 6,0 г или в восьми навесках по 0,75г - в пакетах с защелкивающимся краем;
6. Наставление по применению тест-системы.

### 3. УПАКОВКА

Расфасованные и укупоренные компоненты упакованы в коробку картонную с разделительными перегородками или гнездами, обеспечивающими неподвижность и целостность флакона, пробирок и пластиковых пакетов. В каждую коробку вкладывают "Наставление по применению тест-системы".

### 4. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

Набор диагностический является полностью биологически безопасным, однако, в качестве консерванта иммуноспецифических компонентов ( антиген, сыворотки для контроля ) используется токсичное вещество азид натрия в максимальной концентрации не более 0,1% в неопасных количествах.

Буфер для электрофореза обладает раздражающим действием.

Во избежание соприкосновения кожи и слизистых с указанными компонентами, работу следует проводить в перчатках. В случае попадания компонентов на кожу или слизистые пораженный участок необходимо промыть большим количеством проточной воды. В случае попадания иммуноспецифических компонентов внутрь организма следует вызвать рвоту и обратиться к врачу.

Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы.

Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

При работе с источником тока следует соблюдать общие правила работы с электроприборами.

Утилизация компонентов тест-системы по истечении срока годности проводится путем смыва большим количеством проточной воды. Сыворотки для контроля рекомендуется предварительно автоклавировать при температуре +121°C в течение 40 мин.

## 5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РИОЭФ

### 5.1. Приготовление буфера для электрофореза

Содержимое пакета с буферной смесью (компонент №4) растворяют в 2000 мл дистиллированной воды при помешивании. Раствор для более быстрого растворения можно подогреть до 40°-50°С.

Буфер для электрофореза можно хранить при температуре +2°С+8°С в течение 3 месяцев.

### 5.2. Приготовление 0.75%-ного агарозного геля

В колбу с 800 мл готового буфера для электрофореза вносят, при интенсивном помешивании, агарозу (компонент №5). Нагревают колбу на кипящей водяной бане, при помешивании, до полной прозрачности и однородности содержимого. Допускается дробное использование компонента "агароза" для приготовления геля при соблюдении соотношения 0,75г агарозы / 100мл буфера ( не использовавшегося в электрофорезе)

### 5.3. Заливка стекол гелем агарозы

На чистые маркированные стекла, расположенные на горизонтальной поверхности (заливочный столик), заливают жидкий гель агарозы с температурой 50-55°С из расчета 2 мл геля на 10 см<sup>2</sup> поверхности. Например, на стекло размером: 2,4см x 7,5см (предметное стекло) – 3,5 мл геля; 6см x 9см - 11 мл; 9см x 12см - 24 мл; 8см x 15см – 25мл; 10см x 15см -33мл.

Равномерное помутнение геля через 5-10 минут по всей поверхности стекла свидетельствует о завершении полимеризации агарозы.

### 5.4.Хранение геля агарозы и стекол с гелем

Оставшийся от заливки требуемого количества стекол гель агарозы хранят плотно укупленным при температуре +2°+8°С не более месяца. Для постановки реакции гель повторно расплавляют на водяной бане и заливают требуемое количество стекол. При этом гель не кипятят, так как это ведет не только к испарению буфера и изменению концентрации агарозы, но и к разрушению агарозы.

Готовые стекла с агарозой возможно хранить в герметично закрывающейся емкости, содержащей влагу и исключающей возможность ее испарения (влажной камере), при температуре +2°+8°С до 3 дней.

### 5.5. Нанесение исследуемого материала

Пробойником с диаметром отверстий 1,6 - 2 мм проделывают отверстия на расстоянии 6 - 8 мм друг от друга (считая от центра отверстий). Тонкой иглой или при помощи отсасывающего насоса очищают пробитые отверстия от геля агарозы. В две лунки на пластине (первой и последней четных колонок) вносят положительную контрольную сыворотку (компонент №2). В одну-две лунки на пластине (любой из четных колонок) вносят отрицательную контрольную сыворотку (компонент №3). В остальные лунки четных колонок вносят испытуемые пробы сыворотки крови по 8 - 10 мкл. После нанесения исследуемого материала в оставшиеся лунки (нечетные колонки) вносят антиген (компонент №1) по 8 - 10 мкл. Не рекомендуется долго держать пластины на открытом воздухе, так как это ведет к усыханию геля.

### 5.6. Проведение РИОЭФ

Пластину с нанесенным материалом помещают в камеру для электрофореза. Заполняют электродные отсеки буфером для электрофореза (п. 5.1). К противоположным краям пластины (колонка, содержащая антиген, должна быть обращена к отрицательному полюсу) подсоединяют смоченные в буфере для электрофореза фитили из фильтровальной бумаги так, чтобы фитили покрывали 5-7 мм геля. Включают источник постоянного тока, исходя из напряженности электрического поля 10 - 12 Вольт на сантиметр длины геля, и ведут электрофорез в течение 20 - 45 минут. Если нет возможности измерить напряженность электрического поля, длительность электрофореза подбирают эмпирически, ориентируясь на качество реакции с положительной контрольной сывороткой и прохождение фронта индикатора, содержащегося в антигене, за лунки с исследуемыми сыворотками. В процессе электрофореза между лунками с антигеном и положительными пробами образуются характерные линии преципитации - в виде узкой и четкой полоски, смещенной к лунке с сывороткой. Ввиду неравномерной напряженности электрического поля в геле, реакции в крайней левой колонке будут формироваться быстрее, чем в крайней правой. Поэтому о формировании реакций на стекле следует судить по образованию линии преципитации

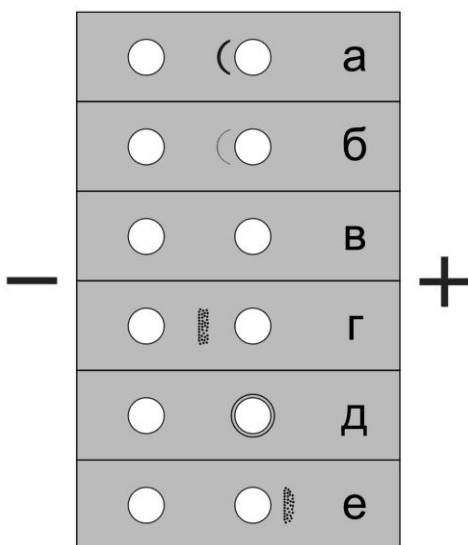
между антигеном и контрольной положительной сывороткой в крайней правой колонке. Рекомендуется завершать реакцию не ранее, чем через 5 минут после образования преципитата антигена с контрольной положительной сывороткой в крайней правой колонке.

В ходе электрофореза может происходить закисление буфера в анодном отсеке и защелачивание в катодном. Поэтому электродный буфер рекомендуется периодически (после 2-3 постановок) сливать в одну емкость, перемешивать и вновь заполнять камеру для электрофореза. В случае неполного использования набора буфер собирают, фильтруют через фильтровальную бумагу или ватный фильтр и хранят при температуре  $+2 - +8^{\circ}\text{C}$  до 3 месяцев.

### 5.7. Учет результатов реакции

По завершении электрофореза, стекла с гелем помещают в концентрированный раствор соли (125г NaCl на литр дистиллированной воды) на 20-30 минут с целью удаления линий, образованных неспецифическими белками, а также ореолов от гемолизированных сывороток. Проводят предварительный учет результатов. Стекла с оставшимися линиями преципитации в испытуемых образцах далее вымачивают в физиологическом растворе (9 г NaCl на литр дистиллированной воды) в течение 4-18 часов и проводят окончательный учет результатов реакции.

Реакции определяют, рассматривая стекла на темном фоне в проходящем свете при мощности лампы не менее 75Вт. При этом иногда требуется менять угол наклона стекла относительно источника света для нахождения такого ракурса, когда линия преципитации с положительной сывороткой в толще геля становится наиболее яркой и четкой. РИОЭФ на стекле считают состоявшейся при наличии четких линий преципитации между лунками с антигеном и контрольной положительной сывороткой и отсутствии любых полос между лунками с антигеном и контрольной отрицательной сывороткой. Отсутствие линии преципитации с положительной контрольной сывороткой и/или наличие какой-либо линии с отрицательной контрольной сывороткой говорит о погрешностях, допущенных при постановке реакции, и требует повторного проведения РИОЭФ.



Положительными признаются реакции, имеющие яркую линию преципитации с четкими границами между лункой с антигеном слева и исследуемым образцом сыворотки справа (рис.1а). Более тонкие слабые, но четкие и неразмытые линии (рис.1б) рекомендуется проверить повторно. При этом кровь у животного рекомендуется брать через 7-21 день.

Отсутствие изменений в геле между лунками (рис. 1в), широкие полосы, расплывшиеся туманности посередине между лункой с антигеном слева и исследуемым образцом справа (рис.1г), ореолы вокруг лунки с испытуемой сывороткой (рис.1д), а также любые линии, локализованные справа от лунки с испытуемой сывороткой (рис.1е) следует считать отрицательным результатом.

В случае затруднения интерпретации результата рекомендуется повторное взятие и исследование образца у соответствующего животного методом РИОЭФ или ИФА.

Следует отметить, что слабые положительные реакции в редких случаях могут наблюдаться в пробах у здоровых животных в течение 2-3 недель после вакцинации. По этой причине желательно проводить исследование не ранее трех недель после вакцинации.

Норок, сыворотки крови которых дали устойчивую, т.е стабильно повторяющуюся, положительную реакцию, признают инфицированными вирусом алеутской болезни и проводят оздоровительные мероприятия согласно действующих инструкций.

## 6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СРОК ГОДНОСТИ

Наборы хранят в сухом темном месте при температуре  $+2^{\circ} - +8^{\circ}\text{C}$ . Антиген (компонент №1) не допускается нагревать выше  $+40^{\circ}\text{C}$  или подвергать воздействию прямых ультрафиолетовых лучей (в том числе солнечных), не рекомендуется замораживать.

Срок годности тест-системы - 12 месяцев со дня выпуска при соблюдении указанных условий хранения.

Наставление разработано ООО "Имген+"