

НАСТАВЛЕНИЕ

по применению тест-системы для диагностики алеутской болезни норок методом иммуноферментного анализа (ИФА)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Тест-система предназначена для массового обследования поголовья норок с целью выявления в крови специфических антител к вирусу алеутской болезни норок (вирусному плазмозитозу).

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

1.3. Набор рассчитан на исследование 2000 неизвестных образцов, 20 контрольных положительных, 20 контрольных слабоположительных и 20 контрольных отрицательных образцов.

2. СОСТАВ НАБОРА И ФОРМА ВЫПУСКА

В состав набора входят:

1. **Мембраны для нанесения образцов** – мембраны на подложке с разметкой на 200 квадратов каждая – 10 шт в пластиковом пакете с защелкивающимся краем,
2. **Натрий углекислый кислый** – порошок белого цвета – 18,5г в пакете с защелкивающимся краем,
3. **Детергент** – прозрачная пенящаяся жидкость – 20 мл во флаконе,
4. **Гидроперит** – таблетка – 1,5 г в пластиковом пакете с защелкивающимся краем,
5. **Блокирующий раствор** - желеобразная жидкость от бледно-желтого до красно-коричневого цвета – 20 мл во флаконе,
6. **Реакционный раствор** - жидкость от бледно-желтого до красно-коричневого цвета – 20 мл во флаконе,
7. **Проявляющий раствор** – жидкость светло-желтого цвета – 25 мл во флаконе,
8. **Антиген** - аморфная масса или жидкость от бесцветного до бледно-желтого цвета - 0,5мл(концентрат), 10мл или 20мл (готовый к применению рабочий раствор) во флаконе,
9. **Антитела** – аморфная масса или жидкость от бесцветного до белого цвета - 0,1мл во флаконе,
10. **Конъюгат** - аморфная масса или жидкость от бесцветного до белого цвета - 0,05мл во флаконе,
11. **Левамизол** – прозрачная жидкость – 0,25мл в пластиковой пробирке
12. Сыворотки крови для контроля (Положительная - (+) **Контроль**, Слабоположительная - (±) **Контроль**, Отрицательная - (-) **Контроль**) – жидкости от бледно-желтого до красно-коричневого цвета – по 0,05 мл в пластиковых пробирках,
13. Ванночка для инкубации – 1 шт
14. Наставление по применению – 1 шт

3. УПАКОВКА

Расфасованные и укупоренные компоненты упакованы в коробку картонную с разделительными перегородками или гнездами, обеспечивающими их неподвижность и целостность. В каждую коробку вложена пластиковая ванночка для инкубации и "Наставление по применению тест-системы".

4. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

Набор диагностический является полностью биологически безопасным. В качестве консерванта иммуноспецифических компонентов (блокирующий раствор, реакционный раствор, антиген, антитела, сыворотки для контроля) используется токсичное вещество азид натрия в концентрации 0,1 %, не являющейся опасной для жизни, но достаточной для отравления при попадании внутрь.

Проявляющий раствор и гидроперит (неразведенный) обладают раздражающим действием.

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

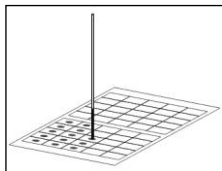
Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы.

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

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

5. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

5.1. Взятие материала для исследования.



Взятие крови у норок проводят **натошак** скарификаторами непосредственно в шедах. Мембрана (компонент №1) **вместе с бумажной подложкой** закрепляется на твердой поверхности двумя-четырьмя иголками. Одна мембрана рассчитана на нанесение 200 проб. Для этого на мембрану нанесена разметка в виде двух квадратов с нумерацией по краям. Нанесение образцов следует вести по горизонтали слева направо по 10 образцов в каждой строке. Зверь ранится острым концом скарификатора в палец лапки. Появляющаяся капля крови подцепляется тупым концом скарификатора. Делается оттиск капельки диаметром 1-2 мм в требуемый квадрат на мембране. Каждый зверь ранится новым скарификатором. Работа проводится в перчатках. По необходимости руки протираются дезинфицирующим раствором спирта или формалина и вытираются насухо. **Необходимо исключить попадание на мембрану с образцами любых посторонних жидкостей (вода, дезинфектанты, испражнения).** После нанесения всех двухсот образцов на одну мембрану, по краю лицевой стороны только шариковой авторучкой ставится порядковый номер мембраны. Отдельно заполняется на бумаге протокол нанесения проб, где указывается соответствие нанесенного образца определенному животному. При невозможности нанесения крови скарификаторами, допускается взятие крови в капилляры с последующим нанесением образца на мембрану без предварительного откручивания в центрифуге. Однако, следует учитывать, что даже микроскопические частицы мыла, пластика и прочих органических веществ, могущие присутствовать на внешней стороне капилляров, в случае соприкосновения с мембраной могут сильно исказить результаты ИФА.

Мембраны с нанесенными образцами сушат в течение 0,5-1 часа в помещении и только потом складывают стопкой подложка-мембрана-подложка-мембрана и т.д. в полиэтиленовый пакет до проведения ИФА (п.5.4). При необходимости проведение анализа можно отложить на срок не позднее 2-х недель после нанесения образцов. В этом случае плотно закрытый пакет с мембранами хранят при комнатной температуре в темном месте.

5.2. Нанесение контролей на мембраны

Контроли (положительный, слабоположительный и отрицательный, компонент №12) наносят с помощью капилляра на свободную поверхность посередине мембраны по две точки на каждый контроль, либо после нанесения материала, либо за 0,5-1 часа до проведения анализа.

5.3. Приготовление реагентов

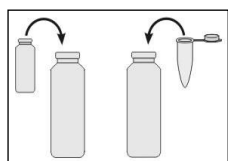
5.3.1. Приготовление отмывающего раствора.

Содержимое пакета с натрием углекислым кислым (компонент №2) растворяют в 2-х литрах дистиллированной воды, добавляют Детергент (компонент №3) и тщательно перемешивают.

5.3.2. Приготовление раствора перекиси водорода

Таблетку гидроперита (компонент №4) растворяют в 30 мл отмывающего раствора. Готовят перед использованием.

5.3.3. Приготовление блокирующего раствора



Флакон с блокирующим раствором (компонент №5) нагревают до температуры +45-50°C. Готовят перед использованием.

5.3.4. Приготовление рабочего раствора антигена

Содержимое флакона с антигеном (компонент №8) разбавляют до 20 мл отмывающим раствором, не нагревая. Добавление отмывающего раствора может вызвать временное резкое помутнение рабочего раствора. Готовят перед использованием.

5.3.5. Приготовление рабочего раствора антител

Содержимое флакона с антителами (компонент №9) переносят без остатка (активное вещество содержится в осадке) в Реакционный раствор (компонент №6). Готовится перед использованием при нагревании до $t +37^{\circ}\text{C}$ или за час до использования при комнатной температуре.

5.3.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Содержимое флакона с конъюгатом (компонент №10) растворяют в 20 мл отмывающего раствора. Готовится перед использованием при нагревании до температуры $+37^{\circ}\text{C}$ или за час до использования при комнатной температуре.

5.3.7. Приготовление проявителя

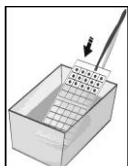
Во флакон с проявляющим раствором (компонент №7), нагретом до температуры $+37^{\circ}\text{C}$, добавляют левамизол (компонент № 11). Проявитель готовят непосредственно перед использованием.

5.4. Проведение иммуноферментного анализа

Все процедуры (за исключением п.5.4.4) проводят при $t +37^{\circ}\text{C}$. Процедуру 5.4.4 проводят при $t +45^{\circ}\text{C}$ раствора. Не допускается нагрев раствора антигена выше $t +38^{\circ}\text{C}$. Процедуры 5.4.1 - 5.4.2, а также отмывку мембран после каждой процедуры допускается проводить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$). Соблюдение температурного режима является необходимым условием качественного проведения реакции. Для равномерного пропитывания мембран реагентом в любой раствор, кроме первого замачивания, все мембраны вносят одновременно при интенсивном покачивании, и затем переключают мембраны по одной в ванночку. Все стадии анализа проводят при постоянном интенсивном покачивании, обеспечивающем перемешивание раствора. Оптимальным является использование термостатируемого шейкера с орбитой не менее 10мм. В случае отсутствия термостатируемого шейкера допускается использование комбинации орбитального шейкера с орбитой не менее 10мм и термостата подходящей вместимости.

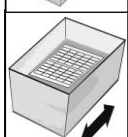
5.4.1. Замачивание мембран (проводят при температуре $+18-37^{\circ}\text{C}$)

Наливают в ванночку около 40 мл отмывающего раствора. Мембрану с предварительно удаленной подложкой опускают в раствор и утапливают в жидкости легким покачиванием ванночки. Таким образом переносят в ванночку все 10 мембран, после чего сливают грязный отмывающий раствор и наливают порцию свежего (30-40 мл). Качают 3-5мин и заменяют отмывающий раствор свежей порцией. Замену отмывающего раствора свежей порцией производят каждые 3-5 мин при покачивании до тех пор, пока раствор в ванночке не перестанет менять цвет от проб крови (4-6 смен). Оставшиеся в местах нанесения проб фибриновые сгустки удаляют осторожным протиранием мембраны кусочком ваты. Длительность стадии должна быть не менее 20 мин



5.4.2. Обесцвечивание мембран (проводят при температуре $+18-40^{\circ}\text{C}$)

Из ванночки с мембранами сливают отмывающий раствор и добавляют раствор перекиси водорода (п. 5.3.2.). Выдерживают при покачивании в течение 5 минут. Сливают из ванночки раствор перекиси и проводят отмывание мембран от остатков перекиси отмывающим раствором (30-40мл) при покачивании. Процедуру смены отмывающего раствора в ванночке повторяют трижды через каждые 3-5 мин. Общее время отмывания должно быть не менее 15 мин.



5.4.3. Блокирование мембран (проводят при температуре $+45^{\circ}-50^{\circ}\text{C}$ раствора)

Из ванночки с мембранами сливают отмывающий раствор, добавляют блокирующий раствор (п.5.3.3.) и проводят процедуру переключивания мембран, для чего мембраны ставят вертикально, опирая на сторону ванночки, и переключают по одной в раствор для обеспечения контакта с каждой мембраной. Накрывают ванночку крышкой из фольги. Инкубируют при $t +45^{\circ}\text{C}$ раствора (не допуская нагрева выше $t +50^{\circ}\text{C}$) в течение 30 минут при покачивании. Отмывают мембраны от блокирующего раствора, три-четыре раза заменяя отмывающий раствор по 30-40 мл каждые 3-5 минут при покачивании. Общее время отмывания должно быть не менее 15 мин.



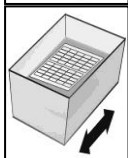
5.4.4. Связывание антигена (проводят при температуре не выше $+37^{\circ}\text{C}$)

Из ванночки с мембранами сливают отмывающий раствор и добавляют раствор антигена (п.5.3.4.). Проводят процедуру переключивания мембран. Накрывают ванночку крышкой из фольги. Инкубируют при $t +30^{\circ}-37^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа при покачивании. Отмывают мембраны от раствора антигена, три-четыре раза заменяя отмывающий раствор по 30-40 мл каждые 3-5 минут при покачивании. Общее время отмывания должно быть не менее 15 мин



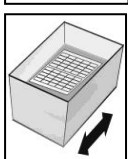
5.4.5. Связывание антител (проводят при температуре $+37^{\circ}\text{C}$)

Из ванночки с мембранами сливают отмывающий раствор и добавляют раствор антител (п.5.3.5.). Проводят процедуру переключивания мембран. Накрывают ванночку крышкой из фольги. Инкубируют при $t +37^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа при покачивании. Отмывают мембраны от раствора антител, три-четыре раза заменяя отмывающий раствор по 30-40 мл каждые 3-5 минут при покачивании. Общее время отмывания должно быть не менее 15 мин



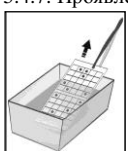
5.4.6. Связывание конъюгата (проводят при температуре $+37^{\circ}\text{C}$)

Из ванночки с мембранами сливают отмывающий раствор и добавляют раствор конъюгата (п.5.3.6.). Проводят процедуру переключивания мембран. Накрывают ванночку крышкой из фольги. Инкубируют при $t +37^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа при покачивании. Отмывают мембраны от несвязавшегося конъюгата, восьмикратно заменяя отмывающий раствор по 40 мл каждые 5 минут при покачивании.



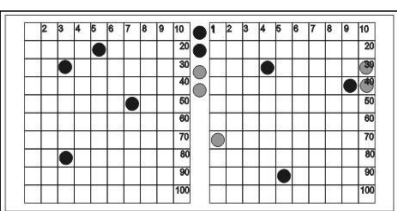
5.4.7. Проявление мембран

Из ванночки с мембранами сливают отмывающий раствор и при интенсивном качании добавляют проявитель (п. 5.3.7), нагретый до $t +37^{\circ}\text{C}$. Проводят процедуру переключивания мембран, накрывают светозащитной крышкой или фольгой. Процесс проявления контролируют визуально. При черно-фиолетовом окрашивании положительного контроля и четком окрашивании слабого положительного контроля (через 5-20 минут при $t +37^{\circ}\text{C}$) проявитель сливают и добавляют 40-50 мл дистиллированной воды. Отмывают от проявляющего раствора 2-3 раза по 2-3 минуты дистиллированной водой, после чего промывают прохладной проточной водой (общим объемом 1-2 литра) и раскладывают на фильтровальной бумаге.



5.5. Учет результатов реакции

Влажные мембраны просматривают в проходящем свете. Появившиеся в квадратах пятна сравнивают с контролями (на просвет). Наличие в квадрате пятна от светло-фиолетового до черного цвета (интенсивность окрашивания слабopоложительного и положительного контроля соответственно) с четкой границей свидетельствует о положительном результате. Соответствующее такой пробе животное считают инфицированным вирусом алеутской болезни норки. Слабые пятна с неопределенными границами, окрашенные мелкие точки, пятна в форме звездочек и т.п. свидетельствуют о различных погрешностях, допущенных при взятии крови, нанесении материала, хранении мембран или в ходе постановки реакции.



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.

Норки, образцы 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 $+2^{\circ}-+8^{\circ}\text{C}$.

Проявляющий раствор (компонент № 7) является светочувствительным, в связи с чем не допускается его нахождение на свету в открытом виде.

Срок годности тест-системы - 6 месяцев со дня выпуска при соблюдении указанных условий хранения.

Наставление разработано ООО "Имген+"