



## 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 в стеклянном флаконе;
2. Положительная контрольная сыворотка (**+Контроль**) – жидкость от бледно-желтого до красно-коричневого цвета - 0,5 мл в пластиковой пробирке;
3. Отрицательная контрольная сыворотка (**- Контроль**) – жидкость от бледно-желтого до красно-коричневого цвета - 0,5 мл 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 - 5,6 г в пакете 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 концентрации 0,05%, не являющейся опасной для жизни.

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°C.

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

#### 5.2. Приготовление 0.7%-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 0,7г 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°C 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 - 25 мл; 8см x 15см – 24мл; 12см x 18см - 43 мл.

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 укупоренным при температуре +2°+8°C 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°C 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 две лунки на пластине (первой и последней 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.

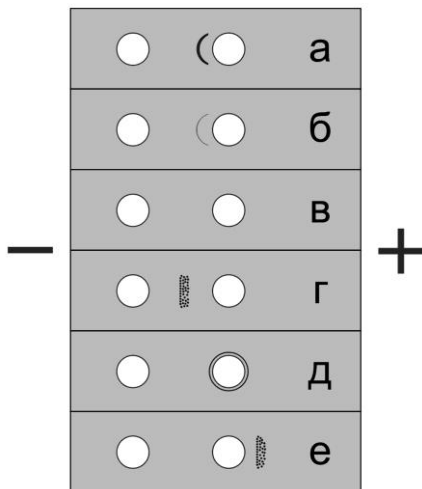
### 5.6. Проведение РИОЭФ

Пластины 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°C до 3 месяцев.

### 5.7. Учет результатов реакции

По завершении электрофореза, стекла с гелем вымачивают в физиологическом растворе (9 г NaCl на литр дистиллированной воды) в течение 4-18 часов, с целью удаления линий, образованных неспецифическими белками, а также ореолов от гемолизированных сывороток. После этого проводят учет результатов реакции. Реакции определяют, рассматривая стекло на темном фоне в проходящем свете. 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). Положительными являются и более тонкие слабые, но четкие и неразмытые линии (рис.1б).

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 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 - +8°C. Антиген (компонент №1) не допускается нагревать выше +40°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+"