

ИНСТРУКЦИЯ
по применению Реагентов для *in vitro* определения видовой специфичности белков сыворотки крови
для судебно-медицинских целей
(Антисыворотки антивидовые СМ)
ТУ 9398-026-27575295-2016

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Реагенты для *in vitro* определения видовой специфичности белков сыворотки крови для судебно-медицинских целей «Антисыворотки антивидовые СМ» предназначены только для профессиональной экспертизы *in vitro*.

Реагенты используются для *in vitro* определения видовой принадлежности белков сыворотки крови в жидкой крови, пятнах, тканях и органах животных.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП МЕТОДА

В комплект поставки входят: реагенты, инструкция по применению, паспорт.

Стандартная фасовка - 1 мл/флакон. Реагенты также могут быть разлиты по 2 мл/флакон.

Стандартная фасовка (1 мл) рассчитана на 20 реакций кольцепреципитации (при расходе 50 мкл/тест), на 50 реакций двойной диффузии в агаровом геле (при расходе 20 мкл/тест) или на 100 реакций встречного иммуноэлектрофореза (при расходе 10 мкл/тест).

Принцип действия антисывороток основан на образовании нерастворимых комплексов антиген-антитело, выявляющихся в виде колец в реакции кольцепреципитации в жидкой среде (в пробирках) или полос преципитации в реакции двойной диффузии в агаровом геле и встречном иммуноэлектрофорезе.

Перечень реагентов:

- антисыворотка против белков сыворотки крови лося;
- антисыворотка против белков сыворотки крови рогатого скота;
- антисыворотка против белков сыворотки крови мелкого рогатого скота;
- антисыворотка против белков сыворотки крови собаки;
- антисыворотка против белков сыворотки крови кошки;
- антисыворотка против белков сыворотки крови медведя.

Все реагенты могут использоваться и поставляться отдельно либо в различных комбинациях.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Антисыворотки антивидовые СМ обладают высокой специфической активностью (титром) и специфичностью, что достигается благодаря удалению гетерологичных антител путем гель-фильтрации на специфических иммуносорбентах.

Специфическая активность (титр) антисыворотки характеризуются образованием преципитата в реакции кольцепреципитации в жидкой среде с соответствующими гомологичными сыворотками не позднее 3 мин при их разведении 1:1000 и не позднее 10 мин, при их разведении 1:5000 и 1:10000. Для антисыворотки против белков сыворотки крови медведя, образование преципитата соответствует 5 мин при их разведении 1:1000 и не позднее 15 мин при разведении 1:5000 и 1:10000.

Специфичность: Антисыворотки антивидовые СМ не образуют кольца преципитации с разведенными 1:1000 сыворотками неродственных видов в течение 1 часа.

Антисыворотки против белков сыворотки крови некоторых видов животных могут образовывать кольца преципитации с сыворотками сравнительно таксономически близких видов, например, медведь – собака; лось – бык, коза. Однако время образования этих колец существенно больше, чем при видовом соответствии. Например, Антисыворотка против белков сыворотки крови лося образует кольца преципитации с сыворотками родственных видов животных: быка – не ранее 3-5 мин, козы – не ранее 20 мин. Антисыворотка против белков сыворотки крови мелкого рогатого скота может образовывать кольца преципитации с сывороткой крупного рогатого скота в течение 10 мин.

Антисыворотка против белков сыворотки крови медведя может образовывать кольца преципитации с родственными видами животных, в частности с собакой, в данном случае необходимо ориентироваться на время появления кольца преципитации: с образцами, содержащими белки сыворотки крови медведя, кольцо появляется быстрее, чем с образцами сыворотки собаки.

В агаровом геле антисыворотки не дают полосу преципитации в течение 24 ч с разведенными 1:100 сыворотками неродственных видов.

Определение специфичности дифференцирующей антисыворотки против белков сыворотки крови мелкого рогатого скота и антисыворотки против белков сыворотки крови лося в агаре не проводится.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Все компоненты реагентов в используемых концентрациях являются нетоксичными.

При работе с реагентами следует надевать одноразовые перчатки, так как исследуемая кровь является потенциально опасным материалом и может содержать патогенные для человека микроорганизмы.

При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

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

Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с реагентами.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С РЕАГЕНТАМИ

- секундомер;
- пластиковые прозрачные микропробирки (типа Эппендорф) вместимостью 0,5 мл;
- пробирки центрифужные вместимостью 5,0 и 10,0 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменяемыми наконечниками, позволяющие отбирать 10, 50, 100 и 1000 мкл;
- камера для электрофореза;
- предметные стекла;
- шаблон (пробойник) или трубка диаметром 4 мм для вырезания лунок в агаре;
- чашки Петри стерильные;
- перчатки резиновые;
- агар кристаллический;
- 0,9% раствор хлорида натрия;
- Боратный буфер pH 8,6: борная кислота (H₃BO₃) - 6,7 г; борат Na (Na₂B₄O₇ *10 H₂O) – 13,4 г; дистиллированная вода – 1 л.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Кровь, сыворотка крови или экстракты из следов крови.

Подготовка исследуемых образцов:

6.1. Кровь поместите в сухую чистую центрифужную пробирку и после образования сгустка центрифугируйте в течение 5 мин при 3000 об/мин. Аккуратно с помощью пипетки отберите сыворотку (надосадочную часть) и поместите ее в чистый флакон. Сыворотка готова для исследования.

6.2. Исследуемые объекты (пятна крови на предметах-носителях) измельчите, поместите в центрифужные пробирки, залейте небольшим количеством 0,9 % раствора хлорида натрия и оставьте для экстрагирования при температуре +(2-8) °C на 18-24 часа. После центрифугирования экстракты перенесите в другие пробирки для выявления в них наличия белка пробой с концентрированной азотной кислотой. Определение проведите в капиллярах. Появление небольшого белесоватого осадка на границе соприкосновения белков экстракта и азотной кислоты свидетельствует о приблизительной концентрации белка 1:1000. Эта концентрация оптимальна для постановки реакции кольцепреципитации в жидкой среде. Экстракты, имеющие большую концентрацию белка, разведите 0,9% раствором хлорида натрия до указанного предела под контролем пробы с азотной кислотой. Для реакции преципитации в агаре рекомендуется использовать образцы белка в меньшем разведении (например, 1:100). Одновременно таким же образом приготовьте экстракты из контрольных участков предметоносителей, которые затем используйте в реакции в неразведенном виде. Мутные вытяжки непригодны для исследования.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты готовы для исследования.

Допускается наличие небольшого осадка или мутности реагентов, устраняемой центрифугированием. Данное свойство не влияет на качество реагентов.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Определение видовой принадлежности исследуемого образца (сыворотки крови, экстракта из пятна) с помощью реакции КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ

1. Внести по 450 мкл антигена - сыворотки, разведенной 1:1000, или экстракта пятна - в несколько пластиковых пробирок объемом 0,5 мл (по количеству антисывороток, но не менее 3-х) и дополнительно в одну контрольную пробирку.

2. В пробирки с сывороткой или экстрактом пятна внести пипеткой аккуратно путем подслаивания по 50 мкл антисыворотки (антисыворотки необходимо отбирать из флакона только стерильными наконечниками). В контрольную пробирку внесите 50 мкл 0,9% раствора хлорида натрия.

3. Учет результатов реакции. Наблюдение за ходом реакции и учет результатов следует проводить невооруженным глазом при искусственном освещении на черном фоне при температуре +(18-25) °С. Отметить время начала реакции и время появления колец преципитации.

Реакцию считают положительной, если кольцо преципитации появляется на границе между антисывороткой и исследуемой сывороткой не позднее, чем через 10 мин, а с антисывороткой против белков сыворотки крови медведя, не позднее 15 мин. Положительная реакция с конкретной антисывороткой свидетельствует о том, что исследуемый образец содержит белок сыворотки крови соответствующего вида животного. При этом реакция должна быть отрицательной в течение времени наблюдения с 0,9 % раствором хлорида натрия (отрицательный контроль).

При применении антисывороток против белков сыворотки крови крупного и мелкого рогатого скота, а также лося с целью дифференциации исследуемого материала по принадлежности одному из вышеперечисленных видов животных, следует иметь в виду, что положительная реакция появится в обоих случаях, но с разницей во времени. При применении антисывороток против белков сыворотки крови медведя и собаки с целью дифференциации исследуемого материала, положительная реакция также появится в обоих случаях, но с разницей во времени. Считать результат положительным необходимо в той пробирке, где кольцо преципитации появилось раньше.

При применении антисывороток против белков сыворотки крови медведя и собаки с целью дифференциации исследуемого материала по принадлежности одному из вышеперечисленных видов животных, следует иметь в виду, что положительная реакция появится во всех случаях, но с разницей во времени и силе реакции. В связи с этим следует считать положительным результат в той пробирке, где кольцо преципитации появилось раньше.

Не рекомендуется использовать для исследования материал с очень высокой концентрацией белка, содержащий различные соли или иные химические соединения, а также материал растительного происхождения, так как это может привести к ложноположительным результатам и затруднить их интерпретацию.

8.2. Определение видовой принадлежности исследуемого образца (сыворотки крови, экстракта пятна) с помощью метода ДВОЙНОЙ ДИФфуЗИИ В АГАРОВОМ ГЕЛЕ

1. На предметное стекло наливают 2,5 мл горячего раствора агара (1,2 % раствор в 0,9% растворе хлористого натрия с 0,02 % азида натрия).

2. После застывания геля в нем специальным шаблоном или трубочкой с острыми краями сделать лунки – одну в центре и несколько лунок (по количеству используемых антисывороток плюс одну для отрицательного контроля, но не больше 6) по периферии вокруг центральной с одинаковыми расстояниями между ними. Диаметр лунки 4 мм, расстояние между центрами лунок 10 мм.

3. В центральную лунку внести 20 мкл антисыворотки (антисыворотки необходимо отбирать из флакона **только стерильными наконечниками**; в периферические лунки – по 20 мкл исследуемых сывороток, разведенных 1:100, или экстрактов пятен. В одну из лунок внести 20 мкл 0,9 % раствора хлорида натрия.

4. Двойную диффузию в геле проводить во влажной камере (чашке Петри) при +(4-8) °С в течение 18-48 часов.

5. Учет результатов реакции. Реакцию считают положительной, если полоса преципитации в агаре между исследуемой сывороткой (экстрактом) и антисывороткой появляется в пределах 18-48 час.

Положительная реакция с конкретной антисывороткой свидетельствует о том, что исследуемый образец содержит белок сыворотки крови соответствующего вида животного. Результаты учитываются при условии отрицательной реакции с 0,9 % раствором хлорида натрия (отрицательный контроль).

8.3. Определение видовой принадлежности исследуемого образца (сыворотки крови, экстракта пятна) с помощью ВСТРЕЧНОГО ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗА

1. Приготовление агара: 6 г сухого агара помещают в колбу и добавляют 400 мл дистиллированной воды и 200 мл буфера для приготовления агара. Разогревают на водяной бане до гомогенной массы.

На предметное, обезжиренное стекло налить разогретый гель, содержащий 1,2 % агара ровным слоем, толщиной 3 мм.

2. После застывания геля в нем вырезать два ряда лунок. В ряд лунок, расположенный ближе к катодному краю пластины, внести антигены (сыворотки или исследуемые образцы). В другой ряд внести антисыворотки. Поместить гель в камеру для электрофореза с бортовым буфером (рН 8.6). Подключить ток так, чтобы антигены мигрировали к аноду. Электрофорез проводить при стабилизированном токе, равном 1,5-2 мА/см в течение 30 мин.

3. Учет результатов реакции проводится визуально в проходящем свете на черном фоне. Реакцию считают положительной при наличии полосы преципитации в геле между лунками с исследуемой сывороткой (экстрактом) и антисывороткой. Положительная реакция с конкретной антисывороткой свидетельствует о том, что исследуемый образец содержит белок сыворотки крови соответствующего вида животного.

При отрицательном результате, можно принять меры для выявления слабо выраженных преципитатов. Для этого пластинку помещают во влажную камеру и проводят повторный учет результатов реакции от 30-40 мин до суток.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре +(2-8) °С. Допускается транспортирование наборов при температуре до +25 °С не более 3 сут.

Срок годности указан на упаковке. Хранение должно осуществляться в упаковке предприятия-изготовителя в сухом месте при температуре +(2-8) °С в течение всего срока годности. Допускается хранение при температуре до +25 °С не более 3 суток.

Вскрытые флаконы с антисыворотками могут храниться при температуре +(2-8) °С в темном месте не более 1 мес.

Для получения надежных результатов необходимо строго соблюдать инструкцию по применению набора.

10. УТИЛИЗАЦИЯ

Реагенты, а также отходы, содержащие кровь и ее компоненты (отходы класса Б), образующиеся в результате использования реагентов, должны быть утилизированы в соответствии с СанПиН 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие реагентов требованиям ТУ 9398-026-27575295-2016 при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных настоящими техническими условиями.

Гарантийный срок годности – 1 год со дня приемки ОККП предприятия-изготовителя.

12. РЕКЛАМАЦИИ

Основаниями для рекламации являются: отсутствие специфической активности, сильно выраженная неспецифичность антисывороток, нарушение целостности флакона, истекший срок годности или недостаточные сведения. При составлении рекламации необходимо указать дату получения, номер серии, причины, по которым реагент признан негодным. Вместе с рекламацией направляют образцы данной серии реагента и протокол с результатами проверки. Рекламацию следует направить на предприятие-изготовитель.

По вопросам качества Реагентов для *in vitro* определения видовой специфичности белков крови для судебно-медицинских целей (Антисыворотки антивидовые СМ) просьба обращаться в ООО «ГЕМАТОЛОГ» по адресу: 125167, Москва, Новый Зыковский пр., д.4, стр.1. тел/факс (495) 504-90-98, 8-800-777-07-72, hematologtd@yandex.ru