

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»
А.В.Кривонос
« 3 » апреля 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления антител
к вирусу классической чумы свиней иммуноферментным методом
“КЧС-СЕРОТЕСТ”

(организация-производитель ООО «Ветбиохим», г. Москва)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор реагентов для выявления антител к вирусу классической чумы свиней иммуноферментным методом “КЧС-СЕРОТЕСТ”.

2. В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

- 1). Планшет для иммуноферментного анализа с иммобилизованным рекомбинантным антигеном Е2 вируса КЧС - 1 шт.;
- 2). Положительная сыворотка (K^+), содержащая антитела к вирусу КЧС, прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная или соломенно-желтого цвета, $0,5\text{ см}^3$ - 1 флакон;
- 3). Отрицательная сыворотка (K^-), не содержащая антител к вирусу КЧС, прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная или соломенно-желтого цвета, $0,5\text{ см}^3$ - 1 флакон;
- 4). 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с Твином 20 для промывки планшетов (ФСБТ), бесцветная прозрачная жидкость, 25 см^3 - 2 флакона;
- 5). Буфер для разведения сывороток (БР), бесцветная прозрачная жидкость, 10 см^3 - 1 флакон;
- 6). Конъюгат моноклональных антител к вирусу КЧС с пероксидазой хрена (Конъюгат), прозрачная жидкость от розового до красного цвета, 10 см^3 - 1 флакон;
- 7). Хромоген - субстратный раствор (ТМБ), бесцветная прозрачная жидкость, 14 см^3 - 1 флакон;
- 8). 1 N серная кислота (Стоп-раствор), бесцветная прозрачная жидкость, 5 см^3 - 1 флакон.

3. Компоненты набора расфасовывают в пластиковые (стеклянные), герметично укупоренные флаконы (пробирки) соответствующей вместимости.

Пластиковые флаконы (пробирки) укупоривают завинчивающимися или защелкивающимися пластиковыми крышками. Стеклоаные флаконы укупоривают резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми или пластиковыми завинчивающимися колпачками.

На флаконы (пробирки) с каждым компонентом наклеивают этикетки с указанием: названия и товарного знака организации-производителя, краткого названия набора, краткого названия компонента, его номера, количества в упаковке, номера серии, номера контроля, срока годности (месяц и год).

Полистироловые планшеты герметично упаковывают в полиэтиленовые пакеты. На пакеты наклеивают этикетки с указанием: организации-производителя и ее товарного знака, краткого названия набора и названия компонента, номера серии и контроля, срока годности.

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ШЕВЧЕНКО Ю.А.

4. На каждую коробку с диагностическим набором наклеивают этикетку, в которой указывают: страну, город, название и товарный знак организации-производителя, полное название набора, номер серии и номер контроля, дату изготовления (месяц и год), срок годности (месяц и год), условия хранения, регистрационный номер, знак соответствия в системе ГОСТ Р, обозначение нормативного документа, надпись «для животных». В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

5. Набор рассчитан на одновременный анализ 46 испытуемых проб (в двух повторях) и двух контрольных (в 2-х повторях). Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения нескольких серий анализов по мере поступления биоматериала.

6. Срок годности компонентов набора - 12 месяцев от даты изготовления при условии хранения и транспортирования их в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C. **Не допускается замораживание компонентов набора!** Запрещено смешивать компоненты наборов разных серий и использовать набор по истечении срока годности.

Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Флаконы без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии плесени или других примесей и не использованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Планшеты и контрольные сыворотки обеззараживают 3% раствором хлорамина. Остальные компоненты набора не требуют специальных мер утилизации.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

7. Метод основан на конкурентном взаимодействии конъюгированных с пероксидазой моноклональных антител к оболочечному белку Е2 вируса КЧС и сывороточных вирусспецифических антител с иммобилизованным на поверхности иммунологического планшета рекомбинантным белком Е2. При отсутствии в исследуемой сыворотке вирусспецифических антител, конъюгат свободно взаимодействует с иммобилизованным белком Е2 и после добавления хромоген-субстратного раствора в лунке развивается окраска. Если исследуемая сыворотка крови содержит вирусспецифические антитела, происходит их взаимодействие с иммобилизованным Е2, его частичная или полная блокировка, в результате чего связывание конъюгата с антигеном и, соответственно, интенсивность окраски снижается. Таким образом, интенсивность окраски обратно пропорциональна количеству антител в исследуемой сыворотке.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

Набор предназначен для выявления специфических антител к вирусу КЧС в сыворотке крови иммуноферментным методом с целью диагностики КЧС у не вакцинированных животных и оценки напряженности иммунитета после вакцинации.

8. Подготовка к исследованию

8.1. Подготовка биологического материала

Для анализа используют сыворотку крови свиней. Сыворотки можно хранить при температуре 4°C не более 3-х суток, при температуре минус 20°C до 50-60 суток. Перед использованием замороженные образцы в течение 5-10 мин нагревают на водяной бане при температуре 37°C.

В случае выпадения осадка в пробах сыворотки крови их обязательно осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 2000g.

Не рекомендуется исследование проросших и гемолизированных проб, а также многократное замораживание и оттаивание образцов.

8.2. Подготовка рабочих растворов

8.2.1. Перед началом работы все реагенты выдерживают 30 мин при комнатной температуре (18-25°C).

8.2.2. Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов (**ФСБТ**). Содержимое флакона № 5 разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой. Пример: для получения 500 мл рабочего раствора к 25 мл концентрата добавляют 475 мл воды. Следует иметь в виду, что для промывания одного стрипа требуется около 30 мл рабочего раствора. Рабочий раствор стабилен при температуре 4°C в течение 3 суток. Для более длительного хранения раствор замораживают и хранят при температуре минус 20°C.

Все остальные компоненты набора готовы к применению.

8.2.3. Для проведения ИФА необходимы одно- и многоканальные автоматические микропипетки разных объемов со сменными наконечниками, мерная лабораторная посуда, дистиллированная вода, термостат с температурой 37°C, спектрофотометр (ридер) с длиной волны 450 нм.

***ВНИМАНИЕ!** Компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя при температуре (2-8) °C. Не переливать в другую посуду! Не смешивать компоненты из наборов разных серий!*

9. Проведение анализа

9.1. В лунки планшета вносят по 75 мкл БР (из расчета по 2 лунки на каждый образец исследуемой сыворотки и по 2 лунки для положительного и отрицательного контролей).

В лунки A1-B1 добавляют по 50 мкл K⁺.

В лунки C1-D1 добавляют по 50 мкл K⁻.

В остальные лунки с БР добавляют по 50 мкл исследуемой сыворотки (по две лунки на каждый образец).

Закрывают планшет липкой пленкой и инкубируют 1,5 час при комнатной температуре (18-25)°C.

9.2. Планшет 5 раз промывают буфером ФСБТ (300 мкл/лунку), каждый раз полностью удаляя жидкость из лунок постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

***ВНИМАНИЕ.** При этой операции возможно выпадение стрипов из рамки! Рекомендуется перед началом работы промаркировать стрипы для восстановления их первоначального расположения.*

9.3. В каждую лунку вносят по 100 мкл раствора конъюгата.

Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 45 мин в термостате при температуре 37°C.

9.4. Планшет 5 раз промывают буфером ФСБТ (п. 9.2.)

9.5. В каждую лунку вносят по 100 мкл хромоген-субстратного раствора (ТМБ).

Планшет инкубируют 20 мин в темном месте при комнатной температуре (18-25)°C.

9.6. Останавливают реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл стоп-раствора.

10. Учет и интерпретация результатов

10.1. Сразу после остановки реакции измеряют оптическую плотность в каждой лунке на спектрофотометре (ридере) с длиной волны 450 нм (A₄₅₀).

10.2. Вычисляют среднее значение A₄₅₀ отрицательного (A₄₅₀ K⁻_{cp}) и положительного (A₄₅₀ K⁺_{cp}) контролей.

Результаты реакции считаются достоверными и могут быть учтены, если:
 $(A_{450}K^-_{cp} - A_{450}K^+_{cp}) \geq 0,3$

Если полученные значения контрольных показателей не соответствуют указанным требованиям, результаты реакции считают не достоверными и реакцию повторяют.

10.3. Если полученные значения контрольных показателей соответствуют указанным требованиям, проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

Вычисляют среднее значение A_{450} для каждой опытной пробы ($A_{450} ОП_{cp}$).

Вычисляют коэффициент ингибирования ($K_{инг}$) связывания конъюгата сывороточными антителами по формуле:

$$K_{инг} = \frac{(A_{450}K^-_{cp} - A_{450}ОП_{cp})}{(A_{450}K^-_{cp} - A_{450}K^+_{cp})} \times 100$$

Если величина $K_{инг}$ более 50%, пробу считают положительной.

Пробу считают отрицательной, если величина $K_{инг}$ менее 50%.

10.4. Если в сыворотке не вакцинированного животного (за исключением поросят от вакцинированных свиноматок, которые имеют колостральный иммунитет до 60-ти дневного возраста) обнаруживают антитела к вирусу КЧС ($K_{инг}$ выше 50%), это свидетельствует о контакте с вирусом и возможном заболевании.

При исследовании напряженности поствакцинального иммунитета необходимо учитывать, что уровень вируснейтрализующих антител в сыворотке обеспечивает устойчивость животного к заражению вирулентным вирусом при $K_{инг}$ выше 60%. Так как развитие гуморального иммунитета начинается на 25 - 30 день после вакцинации, такой анализ рекомендуется проводить не ранее 25 дня после вакцинации.

Информация. Уровень антител к вирусу КЧС у животных может иметь существенные индивидуальные отличия. Не используйте объединенные сыворотки от разных животных. Для получения достоверных результатов, рекомендуется исследовать пробы от животных (не менее 10 голов), одинаковых по условиям содержания, возрасту и т.д. В случае сомнительных результатов рекомендуется повторить анализ тех же образцов сыворотки и применить другие методы анализа антител (реакцию нейтрализации или цитохимический вариант иммуноферментного анализа).

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

11. Работу с компонентами набора следует проводить с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и техники безопасности при работе с биологическим материалом и химическими веществами. В случае попадания их на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим». Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.16.