



УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
Россельхознадзора
Н.А. Власов
«20» января 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антител к антигену gE вируса болезни Ауески
иммуноферментным методом
«Ауески gE – СЕРОТЕСТ»
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к антигену gE вируса болезни Ауески иммуноферментным методом «Ауески gE – СЕРОТЕСТ».
2. В состав набора входят иммunoспецифические и химические компоненты:
 - 1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках **гликопротеином gE ВБА** - 2 штуки;
 - 2). Положительный контроль (**K⁺**), прозрачная жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, 0,5 см³ - 1 пробирка;
 - 3). Отрицательный контроль (**K⁻**), прозрачная жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, 0,5 см³ - 1 пробирка;
 - 4). Моноклональные антитела к антигену gE вируса болезни Ауески, меченные пероксидазой хрена (**Конъюгат**), прозрачная жидкость от голубого до синего цвета, 22,0 см³ - 1 флакон;
 - 5). 20-кратный концентрат буферного раствора для промывки планшетов (**ФСБТ**), бесцветная прозрачная жидкость, 25,0 см³ – 3 флакона;
 - 6). Буфер для разведения сывороток (**БР**), бесцветная прозрачная жидкость, 25,0 см³ – 1 флакон;
 - 7). Субстратный раствор (**СР**), бесцветная прозрачная жидкость, 25,0 см³ - 1 флакон;
 - 8). **Стоп-раствор**, бесцветная прозрачная жидкость, 25,0 см³ - 1 флакон.
3. Набор «Ауески gE-СЕРОТЕСТ» предназначен для выявления специфических антител к антигену gE вируса болезни Ауески (ВБА) иммуноферментным методом (ИФА) с целью дифференциации вакцинированных маркированной вакциной от инфицированных свиней.

Набор рассчитан на проведение на одном планшете одновременного анализа 46 исследуемых проб сыворотки крови и двух контрольных проб (в 2-х повторах). Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения нескольких серий анализов по мере поступления биоматериала.

4. Упаковка и маркировка

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

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

На флаконы (пробирки) с каждым компонентом наклеивают этикетки с указанием:

Названия и/или товарного знака организации-производителя и разработчика, краткого названия набора, краткого названия компонента, его номера, количества в упаковке, номера серии, номера контроля, срока годности (месяц и год).

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

Флаконы (пробирки) с компонентами набора и планшеты упаковывают в картонные или пластиковые коробки с наличием гнезд.

На каждую коробку с диагностическим набором наклеивают этикетку, в которой указывают: страну, город, название и/или товарный знак организации-производителя и разработчика, 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. 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 (кроме сывороток).

Флаконы без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета подлежат выбраковке. Микропанели и контрольные сыворотки обеззараживают 3% раствором хлорамина. Остальные компоненты набора не требуют специальных мер утилизации. Запрещено использовать наборы по окончании срока годности.

Примечание: Для проведения ИФА используют: одно- и многоканальные микропипетки переменных объемов со сменными наконечниками, мерную лабораторную посуду, дистиллированную или деионизованную воду, суховоздушный термостат с температурой 37°C, спектрофотометр с вертикальным лучом света длиной волны 450 нм, липкую пленку.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

6. Метод основан на конкурентном взаимодействии конъюгированных с пероксидазой моноклональных антител к эпитопу gE гликопroteина ВВА и сывороточных специфических антител с иммобилизованным в лунках иммунологического планшета гликопротеином gE.

При отсутствии в исследуемой сыворотке специфических антител, моноклональный коньюгат свободно взаимодействует с иммобилизованным в лунках гликопротеином gE и после добавления субстрата и хромогена в лунке развивается окраска. Если исследуемая сыворотка содержит специфические антитела, то происходит их взаимодействие с иммобилизованным в лунках гликопротеином gE, его частичная или полная блокировка. В результате чего связывание антител коньюгата с антигеном не происходит, или происходит частично и, соответственно, окрашивание отсутствует или интенсивность окраски снижается. Таким образом, интенсивность окраски обратно пропорциональна количеству антител в исследуемой сыворотке.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

7. Подготовка биологического материала

Для анализа используют сыворотку крови свиней. Если анализ проводят в течение 24 ч после отбора, образцы биоматериала хранят при температуре 4°C. При более длительном хранении образцы замораживают при температуре минус 20°C. Перед исследованием замороженные образцы в течение 5 -10 мин нагревают в 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 сывороток, а также многократное замораживание и оттаивание образцов сыворотки крови.

8. Подготовка рабочих растворов

8.1. Перед началом работы все реагенты выдерживают 30 мин при комнатной температуре (20-25°C).

8.2. Рабочий раствор буфера для промывания планшетов (ФСБТ). Содержимое флакона № 5 разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой. (Пример: для получения 500 мл рабочего раствора ФСБТ к 25 мл концентрата добавляют 475 мл воды). Следует иметь в виду, что для обработки одного стрипа требуется примерно 30 мл рабочего раствора. Рабочий раствор ФСБТ стабилен при температуре 4⁰С в течение 3 сут. Для более длительного хранения раствор замораживают и хранят при температуре минус 20⁰С.

8.3. Все остальные компоненты набора готовы к применению.
ВНИМАНИЕ.

При неоднократном использовании компонентов набора контрольные сыворотки рекомендуется расфасовать по 120 мкл в отдельные пробирки типа Эппendorф и хранить до следующего анализа при температуре минус 20⁰С. Другие компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя. Запрещено переливать в другую посуду и смешивать компоненты из наборов разных серий!

9. Проведение анализа

9.1. Во все лунки планшета вносят по 50 мкл буфера для разведения сывороток (БР, флакон № 6).

В лунки A1-B1 и C1-D1 вносят по 50 мкл контрольных проб (K⁺ и K⁻).

В остальные лунки планшета вносят по 50 мкл испытуемых проб сыворотки крови (по две лунки на каждый образец). При внесении образцов в лунки содержимое тщательно перемешивают пипетированием.

Закрывают планшет липкой пленкой и инкубируют 1 ч при комнатной температуре (20-25⁰С) или ночь при 4⁰С.

9.2. Планшет 3 раза промывают рабочим раствором ФСБТ, подготовленным по п. 8.2., на автоматическом промывочном устройстве или вручную, доверху заполняя лунки (300 мкл/лунку), каждый раз полностью удаляя жидкость 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 коньюгата.

Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 30 мин при комнатной температуре (20-25⁰С).

9.4. Планшет 4 раза промывают рабочим раствором ФСБТ (см. этап 9.2).

9.5. В каждую лунку вносят по 100 мкл субстратного раствора.

Планшет инкубируют 10-15 мин при комнатной температуре в темном месте.

9.6. Останавливают реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора.

9.7. После остановки реакции оптическую плотность субстратной смеси измеряют на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм (A₄₅₀).

10. Учет и интерпретация результатов

10.1. На первом этапе проводят оценку средних значений A₄₅₀ отрицательного и положительного контролей, входящих в состав набора. Результаты реакции считаются достоверными и могут быть учтены, если контрольные показатели соответствуют следующим критериям:

$$\begin{aligned} A_{450} K^-_{\text{ср.}} &> 0,8; \\ A_{450} K^+_{\text{ср.}} / A_{450} K^-_{\text{ср.}} &< 0,3. \end{aligned}$$

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют. Если A₄₅₀ отрицательного и положительного контролей соответствуют вышеуказанным критериям, далее проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

10.2. Вычисляют отсекающие значения (*Cut off*), необходимые для правильной интерпретации результатов:

$$\text{Положительный } Cut\ off = A_{450}K^-_{cp} - [(A_{450}K^-_{cp} - A_{450}K^+_{cp}) \times 0,4]$$
$$\text{Отрицательный } Cut\ off = A_{450}K^-_{cp} - [(A_{450}K^-_{cp} - A_{450}K^+_{cp}) \times 0,35]$$

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

10.4. Проводят интерпретацию результатов:

Пробу считают **положительной**, если $A_{450}OP_{cp}$ ниже, чем положительный *Cut off*.

Проба считается **отрицательной**, если $A_{450}OP_{cp}$ выше, чем отрицательный *Cut off*. Пробы, значения $A_{450}OP_{cp}$ которых находятся между положительным *Cut off* и отрицательным *Cut off*, считаются сомнительными и рекомендуется этих животных исследовать повторно спустя 2 недели.

Пример расчета содержания антител к антигену gE ВБА в испытуемых образцах:

Контрольные показатели: $A_{450}K^-_{cp}$ отрицательного контроля = 1,595 ($> 0,8$);
 $A_{450}K^+_{cp}$ положительного контроля = 0,067 ($< 0,3$)

$$\text{Положительный } Cut\ off = 1,595 - [(1,595 - 0,067) \times 0,4] = 0,985$$

$$\text{Отрицательный } Cut\ off = 1,595 - [(1,595 - 0,067) \times 0,35] = 1,065$$

A_{450} опытных проб: $A_{450}OP_{cp}$ №1 = 0,198 и $A_{450}OP_{cp}$ №2 = 1,461

Интерпретация результата:

Проба сыворотки крови №1 содержит антитела к gE ВБА (положительная реакция), что свидетельствует об инфицировании животного или о проведенной вакцинации традиционной (ненаркированной) вакциной. В сыворотке крови №2 специфических антител нет (отрицательная реакция), что свидетельствует либо об отсутствии антител, либо о проведенной вакцинации маркованной по gE вакциной.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

11. Работу с компонентами набора следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. При попадании их на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

12. Запрещается прием пищи и воды, курение в помещении, где проводятся работы с компонентами набора.

13. Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана ООО «Ветбioxим» совместно с фирмой INGENASA (Испания). Организация-производитель – ООО «Ветбioxим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16

С утверждением настоящей инструкции утрачивает силу инструкция по применению набора для выявления антител к антигену gE вируса болезни Ауески иммуноферментным методом «Ауески gE – СЕРОТЕСТ», утвержденная Россельхознадзором 26.06.2008 г.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ ВГНКИ
Регистрационный номер ПВР-1-3.8/02156