



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антител IgM класса к цирковирусу свиней иммуноферментным методом «ЦВС-IgM-СЕРОТЕСТ»
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антител IgM класса к цирковирусу свиней иммуноферментным методом «ЦВС-IgM-СЕРОТЕСТ»

2. Состав набора и внешний вид компонентов:

1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированными в лунках антителами к IgM свиньи - 1 штука.

2). Положительная контрольная сыворотка, содержащая ЦВС-специфические IgM свиньи (K+), жидкость от розового до красного цвета, 1,0 мл -1 флакон.

3). Отрицательная контрольная сыворотка (K-), жидкость от голубого до синего цвета, 1,0 мл - 1 флакон.

4). Рекомбинантный антиген ЦВС, лиофилизированный, пористая масса белого цвета, 1,0 см³ -1 флакон.

5). Конъюгат. 20-кратный концентрат моноклональных антител к антигену ЦВС, меченный пероксидазой хрена, прозрачная жидкость зеленого цвета, 0,5 мл - 1 флакон.

6). 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с Твином-20 для промывки планшетов, разведения проб сывороток и антигена (ФСБТ), прозрачная бесцветная жидкость, 25,0 мл - 3 флакона.

7). Буфер для разведения конъюгата (БРК), прозрачная жидкость от розового до красного цвета, 11,0 мл - 1 флакон.

8). Хромоген-субстратный раствор (ТМБ), бесцветная прозрачная жидкость, 14,0 мл - 1 флакон.

9). 1 М Серная кислота (Стоп-раствор), бесцветная прозрачная жидкость, 5,1 мл -1 флакон.

3. Набор предназначен для выявления антител IgM класса к цирковирусу свиней в сыворотке крови с целью определения стадии развития цирковиральной инфекции.

4. Набор рассчитан на проведение одновременного анализа 46 исследуемых проб сыворотки (в 2 повторях) и двух контрольных проб (в 2 повторях).

Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения нескольких серий анализов по мере поступления биоматериала.

5. Упаковка и маркировка

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/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 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, знак соответствия, обозначение нормативного документа, надпись «для ветеринарного применения». В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

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.

Не 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 других примесей и не использованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Планшеты и контрольные образцы обеззараживают 3% раствором хлорамина или другими сильными окислителями. Остальные компоненты набора не требуют специальных мер утилизации.

Для проведения ИФА необходимы: одно- и многоканальные микропипетки переменных объемов со сменными наконечниками, мерная лабораторная посуда, дистиллированная или деионизованная вода, спектрофотометр с вертикальным лучом света для измерения оптической плотности при длине волны 450 нм.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

7. При добавлении исследуемой сыворотки в лунки планшетов с иммобилизованными антителами к IgM сывороточные иммуноглобулины класса IgM связываются с иммобилизованными антителами. После отмывки лунок и внесения рекомбинантного антигена ЦВС происходит связывание антигена с ЦВС- специфическими антителами класса IgM из сыворотки. В случае отсутствия в исследуемой сыворотке ЦВС-специфических антител связывания антигена не происходит. Связавшийся антиген выявляется после добавления в лунки специфических антител к антигену ЦВС, конъюгированных с пероксидазой хрена. Связанная пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода, и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антигена и, соответственно, ЦВС - специфических антител класса IgM в определяемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Подготовка к исследованию

8.1. Подготовка биологического материала

Для анализа используют сыворотку крови свиней. Образцы биоматериала хранят при температуре 4⁰С не более 3-х суток, при температуре минус 20⁰С до 50-60 суток. Перед исследованием замороженные образцы нагревают в водяной бане при температуре 37⁰С в течение 5-10 минут.

В случае выпадения осадка в пробах их осветляют центрифугированием в течение 10 минут при 2000g.

Сильно гемолизированные и контаминированные сыворотки не пригодны для исследования.

Многократное замораживание и оттаивание образцов не допускается.

8.2. Подготовка рабочих растворов

8.2.1. Перед началом работы все реагенты выдерживают не менее 0,5 часа при комнатной температуре (20⁰ – 25⁰С) и тщательно перемешивают.

8.2.2. *Рабочий раствор буфера для отмывания планшета, разведения проб сывороток крови и антигена (ФСБТ)* готовят из содержимого флакона № 6, разводя необходимое количество 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 обработки одного стрипа требуется примерно 30 мл рабочего раствора. Рабочий раствор стабилен при температуре 4⁰С в течение 7 сут.

8.2.3. *Рабочий раствор антигена.* Содержимое флакона №4 растворяют в 1 мл рабочего раствора буфера для промывки планшета, разведения проб сывороток крови свиней и антигена (ФСБТ), подготовленного по пункту 8.2.2., и доводят объем до 10 мл этим же буфером. Раствор готовят непосредственно перед использованием. Неиспользованный раствор фасуют в пробирки типа «Эппендорф» по 0,8 мл и хранят при температуре минус 20⁰С до следующего исследования, избегая повторного замораживания.

8.2.4. *Рабочий раствор конъюгата.* Концентрат конъюгата (флакон № 5) разводят буфером для разведения конъюгата (БРК, флакон №7) в 20 раз. (Пример: для получения 5 мл рабочего раствора конъюгата к 4,75 мл БРК добавляют 0,25 мл концентрата конъюгата и тщательно перемешивают). Раствор готовят непосредственно перед использованием.

8.2.5. Положительная контрольная сыворотка, содержащая IgM свиньи (К+, флакон №2), Отрицательная контрольная сыворотка (К-, флакон №3), буфер для разведения конъюгата (БРК, флакон №7), хромоген-субстратный раствор (ГМБ, флакон №8), 1 М Серная кислота (Стоп-раствор, флакон №9) – готовы к применению.

Внимание! Компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя при температуре от 2 до 8⁰С. Не переливать в другую посуду! Не смешивать компоненты из наборов разных серий!

9. Проведение анализа

9.1. Для анализа используют сыворотки крови свиньи в разведении 1:100. На первом этапе исследуемые сыворотки разводят в 10 раз рабочим раствором ФСБТ (п. 8.2.2.) в отдельных пробирках типа «Эппендорф» или круглодонных иммунологических планшетах (в состав набора не входят). Пример: для получения 100 мкл пробы сыворотки к 90 мкл ФСБТ добавляют 10 мкл сыворотки. Конечное разведение 1:100 получают непосредственно в планшете для ИФА. Для этого в лунки планшета вносят по 90 мкл ФСБТ и добавляют по 10 мкл разведенных в 10 раз сывороток.

9.2. В лунки А1-А2 планшета вносят по 100 мкл отрицательного контроля (К-, флакон №3); в лунки В1-В2 - по 100 мкл положительного контроля, содержащего ЦВС-специфические IgM свиньи (К+, флакон №2).

Остальные лунки планшета используют для образцов сыворотки подготовленных по п.9.1.

9.3. Закрывают планшет липкой пленкой и инкубируют 1 ч при 37⁰С.

9.4. Планшет 4 раза промывают рабочим буфером ФСБТ, подготовленным по п. 8.2.2., (доверху заполняя лунки), каждый раз полностью удаляя жидкость постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

ВНИМАНИЕ. При этой операции возможно выпадение стрипов из рамки! Рекомендуется промаркировать каждый стрип для восстановления их первоначального расположения.

После процедуры отмывки нельзя допускать подсушивания лунок на воздухе, поэтому следующие компоненты необходимо готовить заблаговременно и добавлять сразу после промывания лунок.

9.5. В каждую лунку вносят по 100 мкл раствора антигена ЦВС, приготовленного по п. 8.2.3.

9.6. Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 час при 37°C.

9.7. Планшет 4 раза промывают буфером ФСБТ (по п. 9.4.).

9.8. В каждую лунку вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п.8.2.4.).

9.9. Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 час при 37°C.

9.10. Планшет 4 раза промывают буфером ФСБТ (по п. 9.4.).

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

9.12. Планшет инкубируют 15 мин в темноте при комнатной температуре.

9.13. Останавливают реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл стоп-раствора (флакон № 9).

9.14. После остановки реакции оптическую плотность субстратной смеси измеряют на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм (A_{450}).

10. Учет и интерпретация результатов

Вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности для проб отрицательного контроля ($A_{450} K^-$ ср.);

Вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности для проб положительного контроля IgM ($A_{450} K^+$ ср.);

Вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности для каждой опытной пробы (A_{450} ОПср.) (если пробы исследовали в двух повторах).

Результаты реакции считаются достоверными и могут быть учтены, если контрольные показатели соответствуют следующим критериям:

$$A_{450} \text{ IgM } K^+ \text{ ср.} > 0,7$$

$$A_{450} K^- \text{ ср.} < 0,3$$

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считаются недостоверными и реакцию повторяют. Если A_{450} отрицательного и положительного контролей соответствуют вышеуказанным критериям, проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

Вычисляют отсекающее значение (Cut off), необходимое для правильной интерпретации результатов.

$$\text{Cut off} = A_{450} K^+ \text{ ср.} \times 0,4$$

Если величина A_{450} (ОПср.) \leq Cut off, пробу считают отрицательной.

Если величина A_{450} (ОПср.) $>$ Cut off, пробу считают положительной.

Для полной оценки состояния развития инфекционного процесса рекомендуется исследовать эти же сыворотки на наличие ЦВС-специфических иммуноглобулинов класса IgG с применением набора «ЦВС-СЕРОТЕСТ». Результаты следует интерпретировать в соответствии с таблицей.

Таблица

Результат исследования	Интерпретация
IgG-/IgM- (отсутствие IgG / отсутствие IgM)	Животное не имело контакта с вирусом или контакт был долгое время назад (более 12 месяцев).

IgG+/IgM- (наличие IgG / отсутствие IgM)	Животное имело контакт с вирусом в течение года, но более месяца назад
IgG-/IgM+ (отсутствие IgG / наличие IgM)	Животное имело контакт с вирусом в течение месяца
IgG+/IgM+ (наличие IgG / наличие IgM)	Животное находится в стадии активной инфекции

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.