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

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления антител к цирковирусу свиней второго типа
(ЦВС-2) иммуноферментным методом "ЦИРКО-СЕРОТЕСТ"
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор реагентов для выявления антител к цирковирусу свиней второго типа (ЦВС-2) иммуноферментным методом «ЦИРКО-СЕРОТЕСТ».

2. Состав набора:

1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках рекомбинантным антигеном ORF2 ЦВС-2 - 1 штука.

2). Положительный контроль **($К^+$)**, прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная или светло-желтого цвета, 1,0 $см^3$ -1 флакон.

3). Отрицательный контроль **($К^-$),** прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная или светло-желтого цвета, 1,0 $см^3$ -1 флакон.

4). 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с Твином 20 для промывки планшетов **(ФСБТ),** прозрачная бесцветная жидкость, 25,0 $см^3$ - 2 флакона.

5). Буфер для разведения сывороток **(БР),** прозрачная бесцветная жидкость, 25,0 $см^3$ - 1 флакон.

6). Буфер для разведения конъюгата **(БРК)**, прозрачная жидкость красного цвета, 11,0 $см^3$ –1 флакон.

7). Антитела к иммуноглобулину G (IgG) свиньи, меченые пероксидазой хрена **(Конъюгат),** 20-х концентрат, прозрачная жидкость розового цвета, 0,5 $см^3$ - 1 флакон.

8). Хромоген-субстратный раствор (ТМБ), прозрачная бесцветная жидкость, 14,0 $см^3$ -1 флакон.

9). 1 М Серная кислота **(Стоп-раствор),** прозрачная бесцветная жидкость 5,1 $см^3$ - 1 флакон.

3. Набор реагентов предназначен для выявления антител к цирковирусу свиней второго типа (ЦВС- 2) в сыворотке крови иммуноферментным методом с целью диагностики цирковирусной инфекции у не вакцинированных животных и оценки напряженности иммунитета после вакцинации.

Набор рассчитан на проведение на одном планшете одновременного анализа 46 исследуемых (в 2 повторах) и двух контрольных сывороток (в 2 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 герметично упаковывают в 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.

Примечание: В наборе содержатся все необходимые для проведения анализа реактивы, за исключением дистиллированной воды. В качестве дополнительного оборудования необходимы микропипетки на 10, 100, 200 и 1000 мкл, мерная лабораторная посуда, суховоздушный термостат с температурой 37^{0}С, спектрофотометр с длиной волны 450 нм.

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°С.

Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Не допускается замораживание компонентов!

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

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

7. Метод основан на взаимодействии иммобилизованного на поверхности лунок планшета рекомбинантного белка цирковируса 2 типа (ORF2) со специфическими антителами из исследуемой пробы сыворотки и последующем выявлении полученного комплекса конъюгатом (мечеными пероксидазой хрена специфическими антителами к IgG свиньи). Связанная пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антител в определяемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Подготовка биологического материала

Для анализа используют сыворотку крови свиней. Если анализ проводят в течение 24 ч после отбора, образцы биоматериала хранят при температуре 4°С. Для более длительного хранения образцы замораживают при минус 20°С. Перед исследованием замороженные образцы в течение 5-10 мин нагревают в водяной бане при температуре 37°С. В случае выпадения осадка пробы обязательно осветляют центрифугированием 10 мин при 2000g. **Многократное замораживание и оттаивание образцов не допускается.**

9. Подготовка рабочих растворов

9.1. Перед началом работы все реагенты выдерживают не менее 0,5 час при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

9.2. **Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов (ФСБТ)**. Содержимое флакона № 4 разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой. (Пример: к 25 мл концентрата добавляют 475 мл воды). При необходимости использования части компонентов следует иметь в виду, что для обработки одного стрипа требуется примерно 30 мл рабочего раствора. Рабочий раствор ФСБТ стабилен при температуре 4^{0}С в течение 3 сут.

9.3. Буфер для разведения сыворотки (БР, № 5), буфер для разведения конъюгата (БРК, № 6), положительный контроль ($К^+$, № 2), отрицательный контроль ($К^-$, № 3), хромоген-субстратный раствор (ТМБ, №8) и стоп-раствор (№ 9) - готовы к применению.

9.4. **Рабочий раствор конъюгата.** Концентрированный раствор (Конъюгат, №7) перед применением разводят в 20 раз в БРК (например, для получения 5 мл рабочего раствора конъюгата к 4,75 мл БРК добавить 0,25 мл концентрата).

Примечание. *Оставшиеся после частичного использования компоненты набора должны храниться плотно закрытыми в заводской упаковке. Не переливать в другую посуду! Не смешивать компоненты из наборов разных серий!*

10. Проведение анализа

10.1. Исследуемые сыворотки разводят в 100 раз БР (например, для получения 300 мкл испытуемой пробы к 297 мкл БР добавить 3 мкл сыворотки).

10.2. В лунки A1-B1 вносят по 100 мкл $К^+$;

В лунки C1-D1 вносят по 100 мкл $К^-$;

В остальные лунки планшета вносят по 100 мкл разведенных испытуемых проб сыворотки крови (по две лунки на каждый образец).

Закрывают планшет липкой пленкой и инкубируют 1 час при температуре 37^0С.

10.3. Планшет 5 раз промывают рабочим раствором ФСБТ на автоматическом промывочном устройстве или вручную (300 мкл/лунку). Затем жидкость из лунок полностью удаляют постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

Примечание. *При этой процедуре возможно выпадение стрипов из рамки! Рекомендуется промаркировать стрипы для восстановления их первоначального расположения.*

10.4. В каждую лунку вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 час при 37^0С.

10.5. Планшет 5 раз промывают рабочим раствором ФСБТ по п. 10.3.

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

Планшет инкубируют 15-20 мин в темноте при комнатной температуре.

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

11. Оценка и интерпретация результатов

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

11.2. Вычисляют среднее значение оптической плотности для положительного контроля ($A_{450}\,К^+_{ср}$) и для отрицательного контроля ($A_{450}\,К^-_{ср}$).

Величина $\Delta = (A_{450}К^+_{ср} - A_{450}К^-_{ср})$ является характеристикой работоспособности набора и должна быть не менее **0,5**. Если $\Delta <$ **0,5**, то к полученным результатам следует относиться как к сомнительным и, по-возможности, повторить анализ.

11.3. Вычисляют среднее значение оптической плотности для каждой опытной пробы ($A_{450}\,ОП_{ср}$).

11.4. Вычисляют коэффициент связывания конъюгата ($К_{св.}$) сывороточными антителами по формуле:

$$К_{св.} = \frac{(A_{450}\,ОП_{ср} - A_{450}\,К^-_{ср})}{(A_{450}К^+_{ср} - A_{450}К^-_{ср})} \times 100$$

Если величина $К_{св.}$ **менее 20%,** пробу считают **отрицательной**.

Если величина $К_{св.}$ **более 20%,** пробу считают **положительной**

Примечание. *Так как развитие гуморального иммунитета начинается на 25-30 день после вакцинации, анализ на наличие антител к цирковирусу 2 типа рекомендуется проводить не ранее 25 дня после вакцинации.*

Для получения достоверных результатов, рекомендуется исследовать группы животных (не менее 10 голов), одинаковых по условиям содержания, возрасту и т.д. Не использовать объединенные сыворотки от разных животных.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

12. 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