



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

«3» апреля 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления антител к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита свиней иммуноферментным методом «ТГС-СЕРОТЕСТ»

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

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита свиней иммуноферментным методом «ТГС-СЕРОТЕСТ»

2. Состав набора

1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным **антигеном вируса ТГС** - 1 штука.

2). Положительный контроль (**K⁺**), прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная или светло-желтого цвета, 1,0 см³ -1 флакон.

3). Отрицательный контроль (**K⁻**), прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная или светло-желтого цвета, 1,0 см³ -1 флакон.

4). 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с Твином 20 для промывки планшетов (**ФСБТ**), бесцветная прозрачная жидкость, 25,0 см³ - 2 флакона.

5). Сыворотка крови лошади, лиофилизированная (**СЛ**), 1,0 см³ - 1 флакон.

6). Буфер для разведения конъюгата (**БРК**), прозрачная жидкость красного цвета, 10,0 см³ -1 флакон.

7). Антитела к иммуноглобулину G (IgG) свиньи, меченые пероксидазой хрена (**Конъюгат**), 20-х концентрат, прозрачная жидкость розового цвета, 0,5 см³ - 1 флакон.

8). Хромоген-субстратный раствор (**ТМБ**), прозрачная бесцветная жидкость, 14,0 см³ -1 флакон..

9). 1 М Серная кислота (**Стоп-раствор**), бесцветная прозрачная жидкость 5,1 см³ - 1 флакон.

Набор реагентов предназначен для выявления антител к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС) в сыворотке крови иммуноферментным методом с целью диагностики ТГС у не вакцинированных животных и оценки напряженности иммунитета после вакцинации.

Внимание! Набор не предназначен для дифференциации антител к вирусу ТГС от антител к респираторному коронавирусу свиней (РКВС)

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

3. Упаковка и маркировка

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

Пластиковые флаконы (пробирки) укупоривают завинчивающимися или защелкивающимися пластиковыми крышками. Стеклоянные 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.

4. 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.

Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Не допускается замораживание компонентов! 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:** 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°C, спектрофотометр с длиной волны 450 нм.*

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

5. Метод основан на взаимодействии иммобилизованного на поверхности лунок планшета антигена вируса ТГС со специфическими антителами из исследуемой 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

6. Подготовка к проведению анализа

6.1. Подготовка биологического материала

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

6.2. Подготовка рабочих растворов

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

6.2.2. **Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов (ФСБТ).** Содержимое флакона № 4 разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой (пример: к 25 мл концентрата добавить 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 3 сут.

6.2.3. **Буфер для разведения сывороток (БР).** Представляет собой рабочий раствор ФСБТ, содержащий 5% сыворотки крови лошади.

БР готовят в 2 этапа:

1. Во флакон с СЛ (№ 5) добавить 1 мл рабочего раствора ФСБТ и тщательно перемешать содержимое до полного растворения.

2. Приготовить необходимое количество БР (например, для приготовления 10 мл БР необходимо к 9,5 мл ФСБТ добавить 0,5 мл раствора СЛ).

ВНИМАНИЕ. *Оставшийся раствор СЛ (№5) хранить в замороженном виде.*

6.2.4. Буфер для разведения конъюгата (БРК, №.6), положительный контроль (К⁺, № 2), отрицательный контроль (К⁻, № 3), хромоген-субстратный раствор (ТМБ, № 8), стоп-раствор (№ 9) - готовы к применению.

6.2.5. **Рабочий раствор конъюгата.** Необходимое количество концентрата (Конъюгат, №7) разводят в 20 раз буфером для разведения конъюгата (БРК) (пример: для получения 5 мл рабочего раствора конъюгата к 0,25 мл концентрата добавить 4,75 мл БРК). Раствор готовят непосредственно перед применением.

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

7. Проведение анализа

7.1. Исследуемые сыворотки развести в 50 раз БР (см.п. 6.2.3). (Например, для получения 250 мкл испытуемой пробы к 245 мкл БР добавить 5 мкл сыворотки и тщательно перемешать).

7.2. В лунки А1-В1 внести по 100 мкл К⁺;

В лунки С1-Д1 внести по 100 мкл К⁻;

В остальные лунки планшета внести по 100 мкл разведенных испытуемых сывороток (по две лунки на каждый образец).

Заклеить планшет липкой пленкой и инкубировать 1 час при температуре 37⁰С.

7.3. Планшет 5 раз промыть рабочим раствором ФСБТ на автоматическом промывочном устройстве или вручную, доверху заполняя лунки (300 мкл/лунку). Затем жидкость полностью удалить постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге, сложенной в несколько слоев.

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

7.4. В каждую лунку внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Планшет закрыть липкой пленкой и инкубировать 1 час при 37⁰С.

7.5. Планшет 5 раз промыть рабочим раствором ФСБТ по п. 7.3.

7.6. В каждую лунку внести по 100 мкл хромоген-субстратного раствора (ТМБ).

Планшет инкубировать 15-20 мин в темном месте при комнатной температуре.

7.7. Остановить реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл стоп-раствора.

8. Оценка и интерпретация результатов

8.1. Сразу после остановки реакции оптическую плотность субстратной смеси измерить на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм (A₄₅₀).

8.2. Вычислить средние значения оптической плотности для положительного контроля (A₄₅₀ К⁺_{ср}) и отрицательного контроля (A₄₅₀ К⁻_{ср}).

Величина $\Delta = (A_{450}K_{cp}^+ - A_{450}K_{cp}^-)$ 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.

8.3. Вычислить средние значения оптической плотности для каждой опытной пробы ($A_{450} ОП_{cp}$).

Вычислить коэффициент связывания конъюгата ($K_{св.}$) сывороточными антителами по формуле:

$$K_{св.} = \frac{(A_{450} ОП_{cp} - A_{450} K_{cp}^-)}{(A_{450} K_{cp}^+ - A_{450} K_{cp}^-)} \times 100$$

Если величина $K_{св.}$ **менее 20%**, пробу считать **отрицательной**.

Если величина $K_{св.}$ **более 20%**, пробу считать **положительной**.

Примечание. 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

9. 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