

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
 Россельхознадзора
 Н.А.Власов
 «*10*» *сентябрь* 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора

для выявления и дифференциации антител к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита и

респираторному коронавирусу свиней иммуноферментным методом

«ТГС/РКВС-СЕРОТЕСТ»

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

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления и дифференциации антител к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита и респираторному коронавирусу свиней иммуноферментным методом «ТГС/РКВС-СЕРОТЕСТ».

2. В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках рекомбинантным антигеном вириуса ТГС – 2 штуки;

2). Положительный контроль для РКВС (K^+ РКВС), бесцветная или с желтоватым оттенком прозрачная жидкость, 0,3 см³–1 флакон;

3). Положительный контроль для ТГС (K^+ ТГС), бесцветная или с желтоватым оттенком прозрачная жидкость, 0,3 см³–1 флакон;

4). Отрицательный контроль (K^-), бесцветная или с желтоватым оттенком прозрачная жидкость, 0,6 см³ – 1 флакон;

5). Антитела к общему эпигопту вириусов ТГС и РКВС, меченные пероксидазой хрена (**Коньюгат А**), прозрачная жидкость от розового до красного цвета, 15,0 см³ – 1 флакон;

6). Антитела к специальному эпигопту вириуса ТГС, меченные пероксидазой хрена (**Коньюгат Б**), прозрачная жидкость от голубого до синего цвета, 15,0 см³ – 1 флакон;

7). 20-кратный концентрат буферного раствора для промывки планшетов (**ФСБТ**), бесцветная прозрачная жидкость, 25,0 см³ – 2 флакона;

8). Буфер для разведения сывороток (**БР**), бесцветная прозрачная жидкость, 20,0 см³ – 1 флакон;

9). Хромоген-субстратный раствор (**СР**), бесцветная прозрачная жидкость, 25,0 см³ – 1 флакон;

10). **Стоп-раствор**, бесцветная прозрачная жидкость, 25,0 см³ – 1 флакон.

3. Набор «ТГС/РКВС-СЕРОТЕСТ» предназначен для выявления и дифференциации антител к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита (ТГС) и респираторному коронавирусу свиней (РКВС) иммуноферментным методом в сыворотке крови свиней.

Набор рассчитан на проведение на одном планшете одновременного анализа 44 исследуемых проб сыворотки крови и четырех контрольных проб. 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 набора! Запрещается смешивать компоненты наборов разных серий, переливать в другую посуду и использовать набор по истечении срока годности.

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.

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, общему для всех коронавирусов (коньюгат А) или конъюгированных с пероксидазой моноклональных антител к специальному эпитопу вируса ТГС (коньюгат Б) и сывороточных вирусспецифических антител с адсорбированным рекомбинантным антигеном вируса ТГС.

При отсутствии в исследуемой сыворотке крови антител к вирусу ТГС или к РКВС, оба коньюгата свободно взаимодействует с иммобилизованным антигеном, формируя иммунный комплекс, и после добавления хромоген-субстратного раствора в лунке развивается окраска.

Если исследуемая сыворотка содержит антитела только к вирусу ТГС, происходит их взаимодействие с иммобилизованным антигеном по двум эпитопам и их частичная или полная блокировка. В результате чего связывание коньюгатов А и Б с антигеном не происходит или происходит частично и, соответственно, окрашивание отсутствует или интенсивность окраски снижается.

Если исследуемая сыворотка содержит антитела к РКВС, блокируется только общий эпитоп антигена (коньюгат А не связывается с антигеном и окраска не развивается), в то время как коньюгат Б свободно взаимодействует с антигеном и в лунке развивается окраска. Таким

образом, используя два коньюгата, можно дифференцировать сывороточные антитела к вирусу ТГС и РКВС.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

7. 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 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 не менее 30 мин при комнатной температуре (20-25⁰) и тщательно перемешивают.

ВНИМАНИЕ. При неоднократном использовании компонентов контрольные сыворотки из набора рекомендуется расфасовать по 120 мкл в отдельные пробирки типа Эппendorф и хранить до следующего анализа при температуре минус 20°C.

Другие компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя.

8.2. Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов (ФСБТ). Содержимое флакона № 7 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 обработки одного стрипа требуется примерно 30 мл рабочего раствора ФСБТ. Рабочий раствор 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.

9. Проведение анализа

9.1. Во все дунки планшета вносят по 50 мкл буфера для разведения сывороток (БР).

9.2. В лунки A1-A2 (соответственно нечетные и четные стрипы) вносят по 50 мкл положительной контрольной сыворотки РКВС (K^+ _{рквс}).

В лунки **B1-B2** (соответственно нечетные и четные стрипы) вносят по **50 мкл** положительной контрольной сыворотки для ТГС (K^+ тгс).

В лунки **C1-C2** и **D1** и **D2** (соответственно нечетные и четные стрипы) вносят по **50 мкл** отрицательной контрольной сыворотки (**K'**).

В остальные лунки планшета (по той же схеме – нечетные и четные стрипы) вносят по **50 мкл** исследуемых **проб** сыворотки.

При внесении образцов содержимое лунок тщательно перемешивают пипетированием. Рекомендуемая схема нанесения образцов на планшет

9.3. Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 ч в термостате при температуре 37⁰С.

9.4. Планшет 4 раза промывают на автоматическом промывочном устройстве рабочим раствором **ФСБТ**, подготовленным по п. 8.2., 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 до начала работы промаркировать стрипы для восстановления их первоначального расположения

9.5. В каждую лунку нечетных стрипов вносят по 100 мкл конъюгата А.

В каждую лунку четных стрипов вносят по 100 мкл конъюгата Б.

Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 30 мин при температуре 37⁰С.

9.6. Планшет 6 раз промывают рабочим раствором ФСБТ (см. этап 9.4).

9.7. В каждую лунку вносят по 100 мкл хромоген-субстратного раствора.

Планшет инкубируют 10 мин в темноте при комнатной температуре. Следует иметь в виду, что интенсивность окрашивания субстратной смеси обратно пропорциональна количеству антител к вирусу ТГС, содержащихся в исследуемых пробах.

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

9.9. 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 достоверности полученных результатов реакции. Реакцию считают достоверной, если средние значения A₄₅₀ для контрольных сывороток соответствуют следующим критериям:

а) A₄₅₀K⁺_{ттс} - для конъюгата А<0,3
- для конъюгата Б<0,3

б) A₄₅₀K⁺_{рквс} - для конъюгата А<0,3
- для конъюгата Б>0,7

в) A₄₅₀K⁻ - для конъюгата А>1,0
- для конъюгата Б>1,0

10.2. Далее вычисляют отсекающие значения (**Cut off**) контрольных проб, необходимые для правильной интерпретации результатов:

а) Cut off (1) = 60% от A₄₅₀K⁻ для конъюгата А (лунки С1, D1)

б) Cut off (2) = 60% от A₄₅₀K⁺_{рквс} для конъюгата Б (лунка А2)

в) Cut off (3) = 70% от A₄₅₀K⁺_{рквс} для конъюгата Б (лунка А2)

10.3. Интерпретацию результатов испытуемых проб проводят в два последующих этапа:

1. Выявление антител к коронавирусу свиней (ТГС+РКВС).

Для этого обсчитывают результаты испытуемых проб относительно конъюгата А:

а) Если A₄₅₀ испытуемых проб выше, чем Cut off (1), то эти пробы считаются отрицательными

б) Если A₄₅₀ испытуемых проб ниже, чем Cut off (1), то это свидетельствует о наличии в пробах антител к коронавирусам свиней (ТГС или РКВС).

2. Дифференциация антител к вирусу ТГС от антител к РКВС

Для этого обсчитывают результаты испытуемых проб относительно конъюгата Б:

а) Пробы, A₄₅₀ которых ниже, чем Cut off (2), считаются положительными на наличие антител к вирусу ТГС.

б) Пробы, A_{450} которых выше, чем Cut off (3), считаются положительными на наличие антител к РКВС и отрицательными на наличие антител к вирусу ТГС.

в) Пробы, A_{450} которых находится между Cut off (2) и Cut off (3) считаются сомнительными на наличие антител к вирусу ТГС.

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

С утверждением настоящей инструкции утрачивает силу инструкция по применению набора для выявления и дифференциации антител к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита и респираторному коронавирусу свиней иммуноферментным методом

«ТГС/РКВС-СЕРОТЕСТ», утвержденная Россельхознадзором 26.06.2008 г.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ ВГНКИ
Регистрационный номер ПВР-1-3.8/02155