

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Руководителя  
Россельхознадзора  
Н.А.Власов  
«*Н.А. Власов*» 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 вируса ТГС – 2 штуки;
- 2). Положительный контроль для РКВС ( $K^+$  РКВС), бесцветная или с желтоватым оттенком прозрачная жидкость,  $0,3 \text{ см}^3$  – 1 флакон;
- 3). Положительный контроль для ТГС ( $K^+$  ТГС), бесцветная или с желтоватым оттенком прозрачная жидкость,  $0,3 \text{ см}^3$  – 1 флакон;
- 4). Отрицательный контроль ( $K^-$ ), бесцветная или с желтоватым оттенком прозрачная жидкость,  $0,6 \text{ см}^3$  – 1 флакон;
- 5). Антитела к общему эпитопу вирусов ТГС и РКВС, меченные пероксидазой хрена (Конъюгат А), прозрачная жидкость от розового до красного цвета,  $15,0 \text{ см}^3$  – 1 флакон;
- 6). Антитела к специфическому эпитопу вируса ТГС, меченные пероксидазой хрена (Конъюгат Б), прозрачная жидкость от голубого до синего цвета,  $15,0 \text{ см}^3$  – 1 флакон;
- 7). 20-кратный концентрат буферного раствора для промывки планшетов (ФСБТ), бесцветная прозрачная жидкость,  $25,0 \text{ см}^3$  – 2 флакона;
- 8). Буфер для разведения сывороток (БР), бесцветная прозрачная жидкость,  $20,0 \text{ см}^3$  – 1 флакон;
- 9). Хромоген-субстратный раствор (СР), бесцветная прозрачная жидкость,  $25,0 \text{ см}^3$  – 1 флакон;
- 10). **Стоп-раствор**, бесцветная прозрачная жидкость,  $25,0 \text{ см}^3$  – 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. Компонировка 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 закупоренные 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<sup>0</sup>С, 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 (конъюгат А) или конъюгированных с пероксидазой моноклональных антител к специфическому эпитопу вируса ТГС (конъюгат 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 конъюгата свободно взаимодействуют 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 конъюгатов 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 (конъюгат А не связывается с антигеном и окраска не развивается), в то время как конъюгат Б свободно взаимодействует с антигеном и в лунке развивается окраска. Таким



9.3. Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют **1 ч** в термостате при температуре **37<sup>0</sup>С**.

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 37<sup>0</sup>С**.

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 (**A<sub>450</sub>**).

## 10. Учет и интерпретация результатов

10.1. На первом этапе проводят оценку достоверности полученных результатов реакции. Реакцию считают достоверной, если средние значения **A<sub>450</sub>** для контрольных сывороток соответствуют следующим критериям:

а) **A<sub>450</sub>K<sup>+</sup><sub>тге</sub>** - для конъюгата А < 0,3  
- для конъюгата Б < 0,3

б) **A<sub>450</sub> K<sup>+</sup><sub>рквс</sub>** - для конъюгата А < 0,3  
- для конъюгата Б > 0,7

в) **A<sub>450</sub>K<sup>-</sup>** - 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 **A<sub>450</sub>K<sup>-</sup>** для конъюгата А (лунки С1, D1)

б) Cut off (2) = 60% от **A<sub>450</sub>K<sup>+</sup><sub>рквс</sub>** для конъюгата Б (лунка А2)

в) Cut off (3) = 70% от **A<sub>450</sub>K<sup>+</sup><sub>рквс</sub>** 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 **A<sub>450</sub>** испытуемых проб выше, чем Cut off (1), то эти пробы считают отрицательными

б) Если **A<sub>450</sub>** 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, **A<sub>450</sub>** которых ниже, чем Cut off (2), считают положительными на наличие антител к вирусу ТГС.

б) Пробы,  $A_{450}$  которых выше, чем Cut off (3), считают 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) считают 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