



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор  
ООО «Ветбиохим»

А.В.Кривонос

2017 г

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антигенов вируса трансмиссивного гастроэнтерита (ТГС) и ротавируса свиней (РВС) методом иммуноферментного анализа (ИФА)  
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

### I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антигенов вируса трансмиссивного гастроэнтерита (ТГС) и ротавируса свиней (РВС) методом иммуноферментного анализа (ИФА).

2. Состав набора:

#### Специфические компоненты:

1. Специфический иммуноглобулин G (IgG) к вирусу ТГС, лиофилизированная гомогенная аморфная масса белого с сероватым оттенком или светло-желтого цвета – 1 флакон, 0,2 см<sup>3</sup>.

2. Специфический иммуноглобулин G (IgG) к РВС, лиофилизированная гомогенная аморфная масса белого с сероватым оттенком или светло-желтого цвета – 1 флакон, 0,2 см<sup>3</sup>.

3. Антиген вируса ТГС, лиофилизированная гомогенная масса светло-желтого цвета с розовым оттенком - 1 флакон, 1,0 см<sup>3</sup>.

4. Антиген вируса РВС, лиофилизированная гомогенная масса светло-желтого цвета с розовым оттенком - 1 флакон, 1,0 см<sup>3</sup>.

5. Меченый пероксидазой хрена специфический иммуноглобулин G к вирусу ТГС (конъюгат), лиофилизированная гомогенная масса светло-желтого цвета - 1 флакон, 0,2 см<sup>3</sup>.

6. Меченый пероксидазой хрена специфический иммуноглобулин G к РВС (конъюгат), лиофилизированная гомогенная масса светло-желтого цвета - 1 флакон, 0,2 см<sup>3</sup>.

#### Неспецифические компоненты:

7. Карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ), прозрачная бесцветная жидкость - 1 флакон, 21 см<sup>3</sup>.

8. 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего твин 20 (ФСБТ), прозрачная бесцветная жидкость - 2 флакона по 25 см<sup>3</sup>.

9. Буферный раствор для разведения реагентов (БДР), прозрачная жидкость красного цвета – 2 флакона по 20 см<sup>3</sup>.

10. Хромоген-субстратный раствор (ТМБ), прозрачная бесцветная жидкость - 2 флакона по 14 см<sup>3</sup>.

11. 1М серная кислота (стоп-раствор), прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон, 10,1 см<sup>3</sup>

12. Плоскодонный полистироловый планшет 96-луночный – 2 штуки.

13. Инструкция по применению набора.

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 товарного знака организации-производителя, краткого названия набора, краткого названия компонента, его номера, количества в упаковке, номера серии, номера контроля, срока годности (месяц и год).

Полистироловые планшеты упаковывают в полиэтиленовые пакеты.

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 товарный знак организации-производителя, 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. **Не допускается замораживание компонентов!** 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.

Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Примечание: Набор содержит все необходимые для анализа компоненты. Дополнительно требуются микропипетки на 100, 200 и 1000 мкл и наконечники к ним, мерная лабораторная посуда, дистиллированная вода, суховоздушный термостат с температурой 37°C, спектрофотометр с длиной волны 450 нм.

## II. ПРИНЦИП МЕТОДА

5. Метод основан на взаимодействии иммобилизованного на поверхности лунок планшетов а специфического иммуноглобулина с антигеном из исследуемой пробы и последующем выявлении полученного комплекса конъюгатом (меченым пероксидазой хрена специфическим иммуноглобулином G к антигенам ТГС или РВС). Связанная пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антигена в определяемой пробе.

## III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

### 6. Подготовка биологического материала

Для анализа используют фекалии, взятые от животных в первые 6 – 12 часов после проявления клинических признаков заболевания. До исследования материал можно хранить в морозильной камере бытового холодильника. Размораживать только перед анализом!

Пробы центрифугируют 10 мин. при 2000-3000 об/мин. Анализируют полученный супернатант. При необходимости пробы суспендируют в минимальном объеме забуференного физраствора (в набор не входит) и центрифугируют в том же режиме.

### 7. Подготовка рабочих растворов

7.1. Перед началом работы все компоненты выдерживают не менее 0,5 ч при комнатной температуре.

7.2. Рабочий раствор для растворения специфических иммуноглобулинов G – карбонатно-бикарбонатный буфер (флакон 7 - **КББ**) - готов к применению.

7.3. Рабочий раствор для промывки планшетов (**ФСБТ**). Содержимое флаконов 8 растворяют в 1000 мл дистиллированной воды. Готовый раствор стабилен 3 суток при 4°C. Для более длительного хранения неиспользованный раствор замораживают и хранят при



минус 20°C.

7.4. Рабочий раствор для растворения контрольных антигенов и конъюгата (флакон 9, БДР) – готов к применению.

7.5. **Хромоген-субстратный** раствор (ТМБ, флакон 10) - готов к применению

7.6. Растворы **специфических иммуноглобулинов** для сенсibilизации планшетов. Содержимое каждого из флаконов 1 и 2 - IgG к вирусу ТГС и IgG к РВС растворяют в 11 мл КББ. Растворы готовят непосредственно перед применением.

7.7. Раствор **специфических антигенов**. Содержимое каждого из флаконов 3 и 4 - специфические антигены ТГС и РВС - растворяют в 1 мл БДР (флакон 9). Растворы готовят непосредственно перед применением. Неиспользованные растворы фасуют в пробирки типа «Эппендорф» по 0,25 мл и хранят при температуре минус 20°C и ниже до следующего исследования, избегая повторного замораживания.

7.8. Раствор **конъюгата**. Содержимое каждого из флаконов 5 и 6 - конъюгаты ТГС и РВС - растворяют в 0,1 мл БДР (флакон 9) и доводят объем до 10 мл этим же буфером. Раствор готовят непосредственно перед использованием. Неиспользованный раствор фасуют в пробирки типа «Эппендорф» по 0,9 мл и хранят при температуре минус 20°C и ниже до следующего исследования, избегая повторного замораживания.

7.9. 1 М серная кислота (**стоп-раствор**, флакон 11) – готов к применению.

## 8. Постановка реакции

8.1. В лунки планшетов вносят по 100 мкл раствора специфического иммуноглобулина G к ТГС или РВС. Один планшет используется для определения вируса ТГС, другой – для РВС.

8.2. Планшеты закрывают липкой пленкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют 18 час при температуре 4°C.

8.3. Планшеты 4 раза промывают буфером ФСБТ (300 мкл/лунку), каждый раз полностью удаляя жидкость из лунок постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

*ВНИМАНИЕ. При этой процедуре возможно выпадение стрипов из рамки. Рекомендуется промаркировать стрипы перед началом работы для восстановления их первоначального расположения.*

*Если количество образцов для исследования не позволяет использовать планшет полностью, то не использованные стрипы с адсорбированным иммуноглобулином, не промывая, помещают в полиэтиленовый пакет и хранят при температуре 4 °C не более 3 суток. По мере необходимости стрипы промывают раствором ФСБТ (п.8.3.) и используют в реакции, начиная с п.8.4.*

8.4. В лунки A1- B1 каждого планшета вносят по 100 мкл БДР - контроль конъюгата.

В лунки C1-D1 каждого планшета вносят по 100 мкл раствора специфического антигена ТГС (см. п.7.7).

В лунки E1-F1 каждого планшета вносят по 100 мкл раствора специфического антигена РВС (см. п.7.7).

Таким образом, в тесте на выявление антигена ТГС в качестве отрицательного контроля используется гетерологичный антиген РВС и наоборот.

В остальные лунки вносят по 100 мкл исследуемых образцов (по 2 лунки на каждый образец)

Планшеты закрывают и инкубируют 1 час при температуре 37°C.

8.5. Планшеты 4 раза промывают буфером ФСБТ.

8.6. Во все лунки планшетов вносят по 100 мкл раствора конъюгата. При этом в лунки, сенсibilизированные IgG к вирусу ТГС, вносят конъюгат ТГС. В лунки, сенсibilизированные IgG к РВС, вносят конъюгат РВС.

Планшеты закрывают и инкубируют 1 час при температуре 37°C.

8.7. Планшеты 4 раза промывают буфером ФСБТ.

8.8. Во все лунки планшетов вносят по 100 мкл хромоген-субстратного раствора (ТМБ).

Планшеты инкубируют 20 мин при комнатной температуре в темном месте.

8.9. Реакцию останавливают добавлением во все лунки планшетов по 50 мкл стоп-раствора.

## **9. Оценка и интерпретация результатов реакции**

### **9.1. Визуальный учет**

Лунки с гомологичным антигеном должны иметь сине-голубое окрашивание до остановки реакции (желтое после остановки реакции).

Лунки с гетерологичным антигеном и лунки контроля конъюгата должны оставаться бесцветными (допускается бледно голубое окрашивание до остановки и слабо желтое - после остановки реакции).

Лунки с исследуемыми образцами, в которых присутствует специфический антиген, должны иметь сине-голубое (желтое после остановки реакции) окрашивание различной интенсивности в зависимости от концентрации антигена.

Реакцию считают положительной, когда заметна четкая разница в интенсивности окрашивания опытных и контрольных (с гетерологичным антигеном) лунок планшета.

### **9.2. Инструментальный учет**

Результаты ИФА учитывают после остановки реакции на спектрофотометре (Ридер) при длине волны 450 нм.

Вычисляют средние значения оптической плотности в лунках с положительными контролями (ОП<sub>ср.</sub> К<sup>+</sup>), отрицательными контролями (ОП<sub>ср.</sub> К<sup>-</sup>) и исследуемых образцов (ОП<sub>ср.</sub> Р).

**Показатель оптической плотности для положительных контролей (ТГС и РВС) должен быть не ниже 0,4, а (ОП<sub>ср.</sub> К<sup>+</sup>) / (ОП<sub>ср.</sub> К<sup>-</sup>) ≥ 3,0.**

Реакцию считают положительной, если соотношении средней величины оптической плотности в лунках с исследуемой пробой (ОП<sub>ср.</sub> Р) к средней величине оптической плотности в лунках с гетерологичным антигеном (ОП<sub>ср.</sub> К<sup>-</sup>) не менее 2,1,

т.е. **(ОП<sub>ср.</sub> Р) / (ОП<sub>ср.</sub> К<sup>-</sup>) ≥ 2,1.**

## **IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ**

10. 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