



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора для выявления антител
к вирусу африканской чумы свиней иммуноферментным методом
«АЧС-СЕРОТЕСТ плюс»
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к вирусу африканской чумы свиней иммуноферментным методом «АЧС-СЕРОТЕСТ плюс».

2. Состав набора и внешний вид компонентов:

1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках рекомбинантным антигеном р30 вируса АЧС - 1 штука.

2). Положительный контроль (K^+) – сыворотка крови, содержащая антитела к антигену вируса АЧС, жидкость от розового до красного цвета, 1,0 мл -1 флакон.

3). Отрицательный контроль (K^-) - сыворотка крови, не содержащая антител к антигену вируса АЧС, жидкость от голубого до синего цвета, 1,0 мл - 1 флакон.

4). Конъюгат - моноклональные антитела к белку р30 вируса АЧС, меченные пероксидазой хрена (50-кратный концентрат) - жидкость зеленого цвета, 0,3 мл - 1 флакон.

5). 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с Твином-20 для промывки планшетов (ФСБТ), прозрачная жидкость бесцветная или с желтоватым оттенком, 25 мл - 2 флакона.

6). Буфер для разведения образцов и конъюгата (БР), прозрачная жидкость от розового до красного цвета, 25 мл - 1 флакон.

7). Хромоген-субстратный раствор (ТМБ), бесцветная прозрачная жидкость, 14 мл - 1 флакон.

8). 1 М Серная кислота (Стоп-раствор), бесцветная прозрачная жидкость, 10 мл -1 флакон.

3. Набор «АЧС-СЕРОТЕСТ плюс» предназначен для выявления специфических антител к вирусу африканской чумы свиней в сыворотке крови.

4. Набор рассчитан на проведение одновременного анализа 92 исследуемых проб сыворотки (в 1 повторе) или 46 проб (в 2 повторях).

Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения нескольких серий анализов по мере поступления биоматериала.

5. Упаковка и маркировка

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

Пластиковые флаконы (пробирки) укупоривают завинчивающимися или защелкивающимися пластиковыми крышками. Стеклоаные 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, 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 пакеты. На пакеты наклеивают этикетки с указанием: названия и/или товарного знака организации-производителя, 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, полное название набора, номер серии и номер контроля, дату изготовления (месяц и год), срок годности (месяц и год), условия хранения, знак соответствия, обозначение нормативного документа, надпись «для ветеринарного применения». В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

6. 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.

Не использовать набор по истечении срока годности.

Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Флаконы без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии других примесей и не использованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Планшеты и контрольные образцы обеззараживают 3% раствором хлорамина или другими сильными окислителями. Остальные компоненты набора не требуют специальных мер утилизации.

Для проведения ИФА необходимы: одно- и многоканальные микропипетки переменных объемов со сменными наконечниками, мерная лабораторная посуда, дистиллированная или деионизованная вода, термостат, спектрофотометр с вертикальным лучом света для измерения оптической плотности при длине волны 450 нм.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

7. Метод основан на конкурентном взаимодействии конъюгированных с пероксидазой хрена моноклональных антител к белку р30 вируса АЧС (конъюгат) и сывороточных вирусспецифических антител с иммобилизованным в лунках планшета рекомбинантным белком р30.

При отсутствии в исследуемой сыворотке вирусспецифических антител, моноклональный конъюгат свободно взаимодействует с иммобилизованным в лунке белком р30 вируса АЧС и, после добавления ТМБ, в лунке развивается окраска.

Если исследуемая сыворотка содержит вирусспецифические антитела, происходит их взаимодействие с иммобилизованным р30, его частичная или полная блокировка. В результате чего связывание антител конъюгата с антигеном не происходит или происходит частично и, соответственно, окрашивание отсутствует или интенсивность окраски снижается.

Таким образом, интенсивность окраски обратно пропорциональна количеству антител в исследуемой сыворотке.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Подготовка к исследованию

8.1. Подготовка биологического материала

Для анализа используют сыворотку крови свиней (объем пробы 0,2-0,3 мл). Образцы сыворотки крови хранят при температуре 4⁰С не более 3-х суток, при температуре минус 20⁰С - до 50-60 суток. Замороженные образцы нагревают в водяной бане при температуре 37⁰С в течение 5-10 минут.

В случае выпадения осадка в пробах их осветляют центрифугированием в течение 10 минут при 2000g.

Сильно гемолизированные и контаминированные сыворотки не пригодны для исследования.

Многократное замораживание и оттаивание образцов не допускается.

8.2. Подготовка рабочих растворов

8.2.1. Перед началом работы все реагенты выдерживают не менее 30 мин. при комнатной температуре (20⁰ – 25⁰С) и тщательно перемешивают.

8.2.2. *Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов (ФСБТ).* Содержимое флакона №5 разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой. (Например, для получения 500 мл рабочего раствора ФСБТ к 25 мл концентрата добавляют 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 суток. Для более длительного хранения раствор замораживают и хранят при температуре минус 20⁰ С.

8.2.3. *Рабочий раствор конъюгата.* Концентрат конъюгата (№4) разводят буфером для разведения (БР, №6) в соотношении 1:50. (Например, для получения 2 мл рабочего раствора конъюгата к 1,96 мл БР добавляют 40 мкл 50-кратного концентрата). Рабочий раствор конъюгата готовят непосредственно перед использованием.

8.2.4. Положительная контрольная сыворотка (К⁺, № 2), отрицательная контрольная сыворотка (К⁻, №3), буфер для разведения проб и конъюгата (БР, № 6), хромоген-субстратный раствор (ТМБ, № 7), стоп-раствор, (№ 8) – готовы к применению.

Внимание! Все исходные компоненты набора стабильны до истечения срока годности. Компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя при температуре от 2 до 8⁰С. Не переливать в другую посуду! Не смешивать компоненты из наборов разных серий!

9. Проведение анализа

9.1. Анализируемые сыворотки крови свиней разводят 1:1 в буфере для разведения проб (БР). (Например, для получения 300 мкл анализируемой пробы к 150 мкл БР добавляют 150 мкл сыворотки).

9.2. В две лунки планшета вносят по 100 мкл отрицательного контроля (К⁻), в две другие лунки планшета - по 100 мкл положительного контроля (К⁺). Остальные лунки планшета используют для образцов сыворотки. В каждую лунку вносят по 100 мкл образцов, подготовленных по п.9.1. Пробы рекомендуется ставить в двух повторах.

Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют в термостате 1 час при 37⁰С.

9.3. Планшет 4 раза промывают рабочим раствором ФСБТ, подготовленным по п. 8.2.2, на автоматическом промывочном устройстве или вручную, каждый раз доверху заполняя лунки (300 мкл на лунку) и полностью удаляя жидкость постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

Внимание! При этой процедуре возможно выпадение стрипов из рамки! Рекомендуется промаркировать стрипы перед началом работы.

После процедуры отмывки нельзя допускать подсушивания лунок на воздухе, поэтому следующие компоненты необходимо готовить заблаговременно и добавлять сразу после промывания лунок.

9.4. В каждую лунку вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, приготовленного по п.8.2.3.

Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют в термостате 1 час при 37⁰С.

9.5. Планшет 4 раза промывают буфером ФСБТ (по п. 9.3.).

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

Планшет инкубируют 15 мин в темноте при комнатной температуре.

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

9.8. После остановки реакции оптическую плотность субстратной смеси измеряют на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм (A₄₅₀).

10. Учет и интерпретация результатов

Проводят оценку средних значений оптической плотности для проб отрицательного контроля (A₄₅₀K⁻) и проб положительного контроля (A₄₅₀K⁺), входящих в состав набора.

Результаты реакции считаются достоверными и могут быть учтены, если контрольные показатели соответствуют следующим критериям:

$$(A_{450} K^-) - (A_{450} K^+) > 0,5$$

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считаются недостоверными и реакцию повторяют. Если A₄₅₀ отрицательного и положительного контролей соответствуют вышеуказанным критериям, проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

Рассчитывают среднее значение оптической плотности для каждой опытной пробы (A₄₅₀ ОП), если пробы исследовали в двух повторах.

Для интерпретации результатов исследования вычисляют коэффициент ингибирования (K_{инг}) связывания конъюгата сывороточными антителами по формуле:

$$K_{инг} = \frac{(A_{450} K^-) - (A_{450} ОП)}{(A_{450} K^-) - (A_{450} K^+)} \times 100$$

Если значение K_{инг} ниже 40% пробу считают отрицательной.

Если значение K_{инг} выше 60% пробу считают положительной.

Если значение K_{инг} находится в интервале от 40% до 60% к полученным результатам следует относиться как к сомнительным и, по возможности, повторить анализ.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

11. 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.