



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

05 ФЕВ 2024

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления антител к ротавирусу А (РВА) свиней иммуноферментным методом

«РВА-СЕРОТЕСТ»

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

### I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор реагентов для выявления антител к Ротавирусу А (РВА) свиней иммуноферментным методом «РВА-СЕРОТЕСТ».

#### 2. Состав набора и внешний вид компонентов:

- 1) Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным рекомбинантным антигеном VP6 Ротавируса А – 1 штука.
- 2) Положительный контроль (К<sup>+</sup>), прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная или светло-желтого цвета, 1,0 мл – 1 пробирка.
- 3) Отрицательный контроль (К<sup>-</sup>), прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная или светло-желтого цвета, 1,0 мл – 1 пробирка.
- 4) 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с Твином 20 для промывки планшетов (ФСБТ), прозрачная бесцветная жидкость, 25,0 мл – 2 флакона.
- 5) Буфер для разведения сывороток и конъюгата (БР), прозрачная жидкость красного цвета, 20,0 мл – 2 флакона.
- 6) Антитела к иммуноглобулину G (IgG) свиньи, меченые пероксидазой хрена (Конъюгат), 20-кратный концентрат, прозрачная жидкость зеленого цвета, 0,5 мл – 1 пробирка.
- 7) Хромоген-субстратный раствор (ТМБ), прозрачная бесцветная жидкость, 14,0 мл – 1 флакон.
- 8) 1 М Серная кислота (Стоп-раствор), прозрачная бесцветная жидкость 5,1 мл – 1 флакон.

3. Набор реагентов (в дальнейшем – набор) предназначен для выявления антител к Ротавирусу А (РВА) в сыворотке крови свиней иммуноферментным методом с целью диагностики ротавирусной инфекции у не вакцинированных животных и оценки напряженности иммунитета после вакцинации

Набор рассчитан для проведения на одном планшете одновременного анализа 46 исследуемых (в 2-х повторях) и двух контрольных сывороток (в 2-х повторях).

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 закупоренные флаконы (пробирки) соответствующей вместимости.

Пластиковые флаконы (пробирки) закупоривают завинчивающимися или защелкивающимися пластиковыми крышками. Стеклоаные флаконы закупоривают 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 герметично упаковывают в полиэтиленовые 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.

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!**

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. Микропанели и контрольные антигены обеззараживают 3% раствором хлорамина. Остальные компоненты набора не требуют специальных мер утилизации.

6. 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

7. Метод основан на взаимодействии иммобилизованного на поверхности лунок планшета рекомбинантного белка VP6 Ротавируса А со специфическими антителами из исследуемой пробы сыворотки крови и последующем выявлении полученного комплекса 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

### 8. Подготовка к исследованию

8.1. **Подготовка биологического материала.** Для анализа используют сыворотку крови свиней. Если анализ проводят в течение 24 ч после отбора, 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. **Многokратное 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 и тщательно перемешивают.

8.2.2. **Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов (ФСБТ).** Содержимое флакона № 4 разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой.

**Пример:** к 25 мл концентрата добавляют 475 мл воды. При необходимости использования части компонентов следует иметь в виду, что для обработки одного стрипа требуется примерно 30 мл рабочего раствора. Рабочий раствор стабилен при температуре 4°C в течение 3 сут.

8.2.3. Буфер для разведения сывороток и конъюгата (БР, № 5), положительный контроль (К+, № 2), отрицательный контроль (К-, № 3), хромоген-субстратный раствор (ТМБ, № 8), стоп-раствор (№ 9) – готовы к применению.

8.2.4. Рабочий раствор конъюгата. Концентрированный раствор конъюгата (Конъюгат, № 6) развести в 20 раз БР (например, для приготовления 5 мл рабочего раствора конъюгата к 4,75 мл БРК добавить 0,25 мл концентрата).

**Внимание! Компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя при температуре от 2 до 8°C. Не переливать в другую посуду! Не смешивать компоненты из наборов разных партий!**

## 9. Проведение анализа

9.1. Испытуемые сыворотки разводят в 100 раз буфером для разведения (БР) (например, для приготовления 300 мкл пробы к 300 мкл БР добавляют 3 мкл сыворотки).

9.2. В лунки А1-В1 вносят по 100 мкл К+;

В лунки С1-Д1 вносят по 100 мкл К-;

В остальные лунки планшета вносят по 100 мкл испытуемых проб сыворотки (по две лунки на каждый образец). Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 ч при температуре 37°C.

9.3. Планшет 5 раз промывают рабочим раствором ФСБТ на автоматическом промывочном устройстве или вручную (300 мкл/лунку). Затем жидкость из лунок полностью удаляют постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

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

9.4. В каждую лунку вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 час при температуре 37°C.

9.5. Планшет 5 раз промывают рабочим раствором ФСБТ по п. 9.3.

9.6. В каждую лунку вносят по 100 мкл хромоген-субстратного раствора (ТМБ). Планшет инкубируют 20 мин в темноте при комнатной температуре.

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

## 10. Учет и интерпретация результатов

10.1. После остановки реакции оптическую плотность субстратной смеси в лунках измеряют на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм ( $A_{450}$ ).

10.2. Вычисляют средние значения оптической плотности для положительного контроля ( $A_{450} K^+$  ср) и для отрицательного контроля ( $A_{450} K^-$  ср).

Средние значения оптической плотности отрицательного и положительного контролей должны быть следующими:

$$A_{450} K^+ > 0,8, \quad A_{450} K^- < 0,3.$$

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют.

10.3. Вычисляют среднее значение оптической плотности для каждой опытной пробы ( $A_{450}$  ОП ср).

10.4. Вычисляют отсекающее значение  $A_{450}$  (Cut off), необходимое для правильной интерпретации результатов:

$$\text{Cut off} = A_{450} K - \times 2,5$$

**Пробу считают положительной, если величина  $A_{450}$  ОП ср  $\geq$  Cut off**

**Пробу считают отрицательной, если величина  $A_{450}$  ОП ср  $<$  Cut off**

10.5. Определение величины титра антител в сыворотках.

При необходимости определения титра специфических антител в верхний ряд планшета (по количеству титруемых проб) внести по 200 мкл положительных сывороток в разведении 1:100. Во все последующие лунки соответствующих вертикальных рядов планшета вносят по 100 мкл БР и проводят последовательные разведения сывороток с шагом 2. В результате получают разведения сывороток с 1:100 до 1:12800. В 4 лунки планшета вносят по 100 мкл контрольных сывороток: 2 лунки для  $K^+$  и 2 лунки для  $K^-$ .

Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 ч при температуре 37°C.

Далее реакцию проводят согласно п. 8.3 – 8.7.

Титром антител следует считать последнее разведение сыворотки, при котором величина  $A_{450}$  ОП  $\geq$  Cut off

#### 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.