



УТВЕРЖДАЮ
Врио директора
ФКП «Ставропольская биофабрика»

Пильтяй
2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антител к вирусу африканской чумы свиней
иммуноферментным методом

(Организация-разработчик: ФКП «Ставропольская биофабрика»,
Российская Федерация, 355019, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Биологическая, д. 18)

I. Общие сведения

1. Набор для выявления антител к вирусу африканской чумы свиней (АЧС) иммуноферментным методом.
2. В состав набора входят следующие компоненты:

| Наименование компонента | Вариант 1 | | Вариант 2 | | Вариант 3 | |
|---|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|
| | Объем, мл | Кол-во | Объем, мл | Кол-во | Объем, мл | Кол-во |
| полистироловый 96-луночный стрипованный микропланшет для постановки ИФА, с адсорбированным в лунках рекомбинантным антигеном р54 вируса АЧС | - | 1 шт. | - | 2 шт. | - | 5 шт. |
| положительный контроль (К ⁺) (красная крышка) – инактивированная свиная сыворотка, содержащая антитела к антигену вируса АЧС | 1 мл | 1 пробир. | 1,8 мл | 1 пробир. | 1,8 мл | 2 пробир. |
| отрицательный контроль (К ⁻) (белая крышка) – инактивированная свиная сыворотка, не содержащая антител к вирусу АЧС | 1 мл | 1 пробир. | 1,8 мл | 1 пробир. | 1,8 мл | 2 пробир. |
| конъюгат №1 (зеленого цвета) – моноклональные антитела к белку р54 вируса АЧС, меченные биотином | 10 мл | 1 флакон | 12 мл | 1 флакон | 28 мл | 1 флакон |
| конъюгат №2 – стрептавидин, меченный пероксидазой хрена | 10 мл | 1 флакон | 12 мл | 1 флакон | 28 мл | 1 флакон |
| разбавитель для анализа (красного цвета) – фосфатно-солевой буферный раствор для разбавления образцов и удаления неспецифических антител | 14 мл | 1 флакон | 14 мл | 1 флакон | 30 мл | 1 флакон |
| промывочный раствор (20-кратный концентрат) – фосфатно-солевой буферный раствор с Твин-20 для промывки планшетов | 28 мл | 1 флакон | 56 мл | 1 флакон | 120 мл | 1 флакон |
| субстрат ТМБ – буферный раствор тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода, реагирующий с пероксидазой хрена с образованием продукта синего цвета | 15 мл | 1 флакон | 24 мл | 1 флакон | 58 мл | 1 флакон |
| стоп-раствор – раствор соляной кислоты для остановки окрашивания | 15 мл | 1 флакон | 24 мл | 1 флакон | 58 мл | 1 флакон |

3. По внешнему виду компоненты набора представляют собой:

- полистироловый 96-луночный стрипованный микропланшет для постановки ИФА, с адсорбированным в лунках рекомбинантным антигеном р54 вируса АЧС – неповрежденный планшет, сухой, прозрачный и без царапин;

- положительный контроль (красная крышка) – жидкость светло-желтого цвета без хлопьев и осадка;

- отрицательный контроль (белая крышка) – жидкость светло-желтого цвета без хлопьев и осадка;

- конъюгат №1 – прозрачную жидкость зеленого цвета без хлопьев и осадка;

- конъюгат №2 – жидкость светло-желтого цвета без хлопьев и осадка;

- разбавитель для анализа – жидкость красного цвета без хлопьев и осадка;

- промывочный раствор (20-кратный концентрат) – прозрачную жидкость, рН 6,8-7,2;

- субстрат ТМБ – прозрачную бесцветную жидкость без осадка, рН 3,3-3,8;

- стоп-раствор – прозрачную жидкость, рН <1.

4. Жидкие компоненты набора расфасованы в пробирки и пластиковые флаконы с завинчивающимися крышками, упакованы в полиэтиленовые пакеты с замком.

Микропланшеты герметично упакованы в индивидуальные фольгированные полиэтиленовые пакеты с влагопоглотителем.

На пробирки и флаконы с компонентами наклеены этикетки с указанием: наименования организации-производителя, ее товарного знака, название компонента, объема в пробирке/флаконе, номера серии, даты изготовления (мес., год), срока годности (мес., год). На этикетку может быть нанесена дополнительная информация.

На каждый планшет наклеена этикетка с указанием наименования организации-производителя и ее товарного знака, наименования антигена, адсорбированного в лунках планшета, номера серии, даты изготовления (мес., год), срока годности (мес., год).

Все компоненты набора в количестве, указанном в п.2, упакованы в картонную коробку с наличием перегородок, обеспечивающих их неподвижность и целостность.

На каждой коробке с набором указаны: наименование организации-производителя её адрес и товарный знак, название набора, перечень компонентов, входящих в набор, количество компонентов в наборе, номер серии набора, дата выпуска (мес., год), срок годности (мес., год), условия хранения и транспортирования, обозначения СТО, информация о подтверждении соответствия (при наличии), штрих-код и надпись «Для ветеринарного применения». На коробку может быть нанесена дополнительная информация.

В коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

5. Набор рассчитан на проведение 96 (вариант 1) /192 (вариант 2) /480 (вариант 3) анализов (включая контроли) в одном повторе или 48/96/240 анализов (включая контроли) в двух повторах. Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения исследований по мере поступления биологического материала.

6. Срок годности набора 18 месяцев с даты выпуска, при соблюдении условий хранения и транспортирования. Запрещено смешивать компоненты наборов разных серий и использовать набор по истечении срока годности компонентов.

7. Набор хранят и транспортируют всеми видами транспорта при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте. Допускается транспортировка набора при температуре до 25 °С в течение 15 суток.

*Если не планируется использование набора более одного месяца, рекомендуется хранить положительный (K^+) и отрицательный контроль (K^-), конъюгаты №1 и №2 при

температуре минус 20 °С или в морозильной камере.

Компоненты набора без маркировки, с нарушением целостности и/или укупорки, с измененным внешним видом, с наличием посторонних примесей, с истекшим сроком годности, подвергшиеся замораживанию, подлежат выбраковке. Планшеты и контрольные образцы обеззараживают 3%-ным раствором хлорамина или другими сильными окислителями. Остальные компоненты набора не требуют специальных мер утилизации.

II. Принцип метода

8. Метод основан на конкурентном взаимодействии содержащихся в исследуемых сыворотках вирусспецифических антител и комплекса, состоящего из конъюгированных с биотином моноклональных антител к белку р54 вируса АЧС (конъюгат №1) и стрептавидина, меченного пероксидазой хрена (конъюгат №2) с иммобилизированным в лунках планшета рекомбинантным белком р54.

При отсутствии в исследуемой сыворотке вирусспецифических антител, комплекс конъюгированных с биотином моноклональных антител и стрептавидина, меченного пероксидазой хрена свободно взаимодействует с адсорбированным в лунке белком р54 вируса АЧС и, после добавления субстрата ТМБ, фермент комплекса вызывает разложение субстрат-индикаторного раствора и образование в лунке окрашенного продукта синего цвета. Реакцию останавливают, добавляя стоп-раствор (цвет продукта меняется с синего на желтый).

Если исследуемая сыворотка содержит вирусспецифические антитела, происходит их взаимодействие с иммобилизированным белком р54, его частичная или полная блокировка, связывания комплекса конъюгированных с биотином моноклональных антител и стрептавидина, меченного пероксидазой хрена с антигеном не происходит или происходит частично и, соответственно, окрашивание отсутствует или интенсивность окраски снижается.

Интенсивность окраски обратно пропорциональна количеству антител в исследуемой пробе:

- бледно-желтое окрашивание – результат положительный;
- интенсивное темно-желтое окрашивание – результат отрицательный.

Все оттенки желтого между темным и бледным представляют различную степень позитивности исследуемых образцов.

III. Порядок применения

9. Набор предназначен для выявления специфических антител к вирусу АЧС в сыворотке (плазме) крови свиней иммуноферментным методом.

10. Оборудование и материалы

Для работы с набором необходимы следующие оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- спектрофотометр (ридер) (длина волны 450 нм);
- термостат с температурой нагрева (37,0±1) °С;
- центрифуга-вортекс для сброса микрокапель со стенок и крышки пробирок после перемешивания образцов;
- одно- и многоканальные автоматические микропипетки разных объемов (10, 20, 100 и 1000 мкл) со сменными наконечниками;
- мерная лабораторная посуда;
- дистиллированная вода.

11 Подготовка к исследованию

11.1 Подготовка биологического материала

Для постановки ИФА могут быть использованы пробы сывороток (плазмы) крови свиней без признаков гемолиза и бактериологической контаминации (хлопья, помутнение). Сыворотки можно хранить при температуре 2 °С до 8 °С не более 7 суток или при температуре минус 20 °С до 50 суток. Многократное замораживание и оттаивание образцов не допускается.

11.2 Приготовление рабочих растворов

11.2.1 Перед началом работы все компоненты набора выдерживают не менее 30 минут при комнатной температуре.

11.2.2 Приготовления промывочного раствора (1×)

Если при хранении концентрата промывочного раствора образовался осадок солей, перед применением флакон следует подержать при комнатной температуре и тщательно перемешать до полного растворения осадка. Для приготовления промывочного раствора необходимо развести один объем 20-кратного промывочного раствора в девятнадцати объемах дистиллированной воды и тщательно перемешать. Рабочий раствор хранят при температуре от 2 С до 8 °С в течение месяца при необходимости.

12 Проведение анализа

12.1 Количество реагентов, необходимое для постановки одной реакции:

| Наименование компонента | Объем на лунку |
|---|----------------|
| Положительный контроль/Отрицательный контроль | 100 мкл |
| Исследуемый образец | 50 мкл |
| Разбавитель для анализа (красного цвета) | 50 мкл |
| Конъюгат №1 | 50 мкл |
| Конъюгат №2 | 50 мкл |
| Промывочный раствор (1×) | 2 мл |
| ТМБ субстрат | 100 мкл |
| Стоп-раствор | 100 мкл |

Примечание: Контроли должны выполняться в двух повторах.

12.2 Все компоненты набора перед использованием должны иметь комнатную температура (20-25°С) и однородность (встряхнуть флаконы перед применением).

12.3 Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов. Одноразовый пластик (пробирки, флаконы, наконечники, планшеты) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство.

12.4 Из комплекта набора берут стрипованный планшет с адсорбированным антигеном, необходимое количество стрипов оставляют в планшете, нумеруют их в соответствии с описью исследуемых образцов водостойким маркером из-за возможного выпадения из рамки-держателя во время исследования. Оставшиеся стрипы хранят плотно закрытыми в полиэтиленовом пакете с влагопоглотителем, при температуре от 2 °С до 8 °С до истечения срока годности.

12.5 В две лунки планшета вносят по 100 мкл отрицательного контроля (K⁻), в две другие лунки – по 100 мкл положительного контроля (K⁺). Остальные лунки планшета используют для образцов сыворотки (плазмы).

12.6 Исследуемые сыворотки (плазмы) крови разводят 1:1 разбавителем для анализа, с этой целью вносят по 50 мкл разбавителя для анализа (красного цвета) в каждую лунку для образцов, а затем добавляют по 50 мкл исследуемых сывороток.

12.7 Перемешивают содержимое лунок, осторожно покачивая планшет вручную в течение 1 минуты.

12.8 Планшет закрывают крышкой (фольгой или липкой пленкой) и инкубируют в течение 30 минут в термостате при температуре 37°C.

12.9 После инкубации лунки планшета освобождают от содержимого путем стряхивания в емкость с дезредством и вносят в каждую лунку по 250 мкл промывочного раствора 1× (п.11.2.2). Содержимое стряхивают, процедуру промывки повторяют еще 3-4 раза. После последней промывки содержимое лунок тщательно стряхивают.

Не допускается высыхания лунок между этапами промывки, поэтому следующие компоненты нужно готовить заранее и добавлять сразу после промывания лунок.

12.10 Во все используемые лунки вносят по 50 мкл конъюгата №2, а затем в каждую лунку добавляют по 50 мкл конъюгата №1.

12.11 Перемешивают содержимое лунок, осторожно покачивая планшет вручную в течение 1 минуты. Планшет закрывают крышкой (фольгой или липкой пленкой) и инкубируют в течение 30 минут в термостате при температуре 37°C.

12.12 После инкубации процедуру промывки лунок повторяют как описано в п.12.9.

12.13 Во все используемые лунки вносят по 100 мкл субстрата ТМБ. Планшет закрывают крышкой (фольгой или липкой пленкой) и инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре в темном месте.

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

13 Учет и интерпретация результатов

13.1 Сразу после остановки реакции (в течение 15 минут после прекращения проявления цвета) измеряют оптическую плотность в каждой лунке на спектрофотометре (ридере) с длиной волны 450 нм (ОП₄₅₀).

13.2 Вычисляют среднее значение ОП₄₅₀ отрицательного (ОП₄₅₀K⁻_{cp}) и положительного (ОП₄₅₀K⁺_{cp}) контролей.

13.3 Если пробы исследовались в двух повторах, рассчитывают среднее значение оптической плотности для каждой опытной пробы (ОП₄₅₀ пробы).

13.4 Рассчитывают процент ингибирования (ПИ) всех образцов по следующей формуле:

$$\text{ПИ (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{ОП}_{450} \text{пробы}}{\text{ОП}_{450} \text{K}_{\text{cp}}^-} \right) \right] \times 100 \%$$

Результаты считаются достоверными и могут быть учтены, если:

$$\text{ОП}_{450} \text{K}_{\text{cp}}^- \geq 0,5;$$

$$\text{ПИ для ОП}_{450} \text{K}_{\text{cp}}^+ \geq 55\%;$$

Если полученные значения контрольных показателей не соответствуют указанным требованиям, результаты реакции считают не достоверными и реакцию повторяют.

13.5 Результат анализа проб сывороток (плазмы) крови свиней со значениями ПИ <40% считают отрицательным (антитела к вирусу АЧС отсутствуют), ПИ ≥50 % - результат положительный (в исследуемом образце присутствуют антитела к вирусу АЧС), если 50% > ПИ ≥40%, то результат считают сомнительным, необходимо, по возможности, повторить анализ через 1-2 недели.

13.6 Полученные положительные результаты должны быть подтверждены при помощи одного из альтернативных методов анализа.

IV. Меры личной профилактики

14. При работе с компонентами набора следует соблюдать санитарно-эпидемиологические правила и правила техники безопасности, предусмотренные при работе с биологическим материалом и химическими веществами.

15. Все работы необходимо проводить в соответствующей спецодежде с обязательным использованием средств индивидуальной защиты. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

16. При попадании компонентов набора на открытые участки тела или слизистую оболочку глаз, рта, носа их тщательно промывают водой.

Инструкция разработана: ФКП «Ставропольская биофабрика», 355019, Российская Федерация, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Биологическая, д.18.

Организация-производитель: ФКП «Ставропольская биофабрика», 355019, Российская Федерация, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Биологическая, д.18.