





ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антител к вирусу классической 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 классической чумы свиней (КЧС) иммуноферментным методом.

2. Набор предназначен для проведения реакции иммуноферментного анализа (ИФА) с целью обнаружения антител к вирусу КЧС в сыворотке (плазме) крови свиней.

3. В состав набора входят следующие компоненты:

Наименование компонента	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4
	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во
полистироловый стрипованный микропланшет для постановки ИФА, с адсорбированным в лунках рекомбинантным антигеном E2 вируса КЧС	1×48	1×96	2×96	5×96
положительный контроль (K ⁺) (красная крышка) – инактивированная свиная сыворотка, содержащая антитела к антигену вируса КЧС	1×0,10 мл	1×0,15 мл	1×0,2 мл	1×0,5 мл
отрицательный контроль (K ⁻) (белая крышка) – инактивированная свиная сыворотка, не содержащая антител к вирусу КЧС	1×0,10 мл	1×0,15 мл	1×0,2 мл	1×0,5 мл
конъюгат антивидовой иммунопероксидазный	1×8 мл	1×12 мл	1×24 мл	1×58 мл
разбавитель для анализа (красного цвета) – фосфатно-солевой буферный раствор для разбавления образцов и удаления неспецифических антител	1×10 мл	1×15 мл	1×22 мл	1×55 мл
разбавитель (10-кратный концентрат) – фосфатно-солевой буферный раствор для разбавления образцов	1×8 мл	1×12 мл	1×12 мл	1×28 мл
промывочный раствор (20-кратный концентрат) – фосфатно-солевой буферный раствор с Твин-20 для промывки планшетов	1×20 мл	1×28 мл	1×56 мл	1×120 мл
субстрат ТМБ – буферный раствор тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода, реагирующий с пероксидазой хрена с образованием продукта синего цвета	1×10 мл	1×15 мл	1×24 мл	1×58 мл
стоп-раствор – раствор соляной кислоты для остановки окрашивания	1×10 мл	1×15 мл	1×24 мл	1×58 мл

4. По внешнему виду компоненты набора представляют собой:

- полистироловый 96-луночный стрипованный микропланшет для постановки ИФА, с адсорбированным в лунках рекомбинантным антигеном E2 вируса КЧС – 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 антивидовой иммунопероксидазый – прозрачную жидкость без хлопьев и осадка;

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

- разбавитель (10-кратный концентрат) – прозрачную жидкость без хлопьев и осадка;

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

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

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

5. Жидкие компоненты набора расфасованы в пробирки и пластиковые флаконы с завинчивающимися крышками. Отрицательный и положительный контроли упакованы в отдельный полиэтиленовый пакет 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, названия компонента, объема в пробирке/флаконе, номера серии, даты выпуска (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 выпуска (мес., год), срока годности (мес., год).

Все компоненты набора в количестве, указанном в п.3, упакованы в картонную коробку, обеспечивающую 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, обозначение 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.

6. Набор рассчитан на проведение 48 (вариант 1)/ 96 (вариант 2) /192 (вариант 3) /480 (вариант 4) анализов (включая контроли). Компонировка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения исследований по мере поступления биологического материала.

7. 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.

8. 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 контроли (K^-), конъюгат 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.

Утилизация обеззараженных компонентов набора не требует соблюдения специальных мер предосторожности.

II. Принцип метода

9. Набор основан на непрямом варианте ИФА, сущность которого заключается в специфическом взаимодействии иммобилизованного в лунках планшета рекомбинантного антигена Е2 вируса КЧС со специфическими антителами, содержащимися в исследуемых пробах сыворотки (плазмы), с последующим присоединением к полученному комплексу антивидового иммуноглобулина, меченного ферментом (пероксидазой хрена), способным вызвать разложение субстрата с образованием цветного продукта ферментативной реакции.

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе:

- при наличии антител в исследуемых образцах проявляется синее окрашивание; цвет меняется с синего на желтый после добавления стоп-раствора (результат положительный);
- при отсутствии антител в исследуемых образцах окрашивания содержимого лунок планшета не происходит (результат отрицательный).

III. Порядок применения

10. Набор предназначен для выявления специфических антител к вирусу КЧС в сыворотке (плазме) крови свиней иммуноферментным методом с целью диагностики КЧС у не вакцинированных животных и оценки напряженности поствакцинального иммунитета у вакцинированных.

11. Оборудование и материалы

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

- спектрофотометр (ридер) (длина волны 450 нм);
- 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;
- микропробирки объемом 0,5-1,5 мл (для разведения образцов);
- дистиллированная или деионизированная вода.

12 Подготовка к исследованию

12.1 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 от 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.

Исследуемые сыворотки (плазмы) разводят в 2 раза раствором разбавителя (1×) (п.12.2.2), используя для каждой пробы новый наконечник. Например, 60 мкл сыворотки (плазмы) добавляют к 60 мкл раствора разбавителя и трижды пипетируют. Разведение выполняется при комнатной температуре.

12.2 Приготовление рабочих растворов

12.2.1 Перед началом работы планшеты и все компоненты набора выдерживают не менее 30 минут при комнатной температуре.

12.2.2 Приготовление раствора разбавителя (1×)

Для приготовления раствора разбавителя необходимо развести один объем 10-кратного раствора разбавителя в девяти объемах дистиллированной воды и тщательно перемешать.

12.2.3 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.

13 Проведение анализа

13.1 Количество реагентов, необходимое для постановки одной реакции:

Наименование компонента	Объем на лунку
Исследуемый образец/ Положительный контроль/ Отрицательный контроль	10 мкл
Разбавитель для анализа (красного цвета)	90 мкл
Конъюгат	100 мкл
Промывочный раствор (1×)	2 мл
ТМБ субстрат	100 мкл
Стоп-раствор	100 мкл

Примечание: Контроли должны выполняться в двух повторах.

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

13.3 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.

13.4 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 в полиэтиленовом пакете с влагопоглотителем, при температуре от 2°С до 8 °С до истечения срока годности.

13.5 Вносят по 90 мкл разбавителя для анализа (красного цвета) в каждую лунку планшета/стрипа с адсорбированным антигеном.

13.6 В две лунки планшета вносят по 10 мкл отрицательного контроля (K^-), в две другие лунки – по 10 мкл положительного контроля (K^+). В остальные лунки с разбавителем

внести по 10 мкл разведенных исследуемых сывороток.

13.7 Перемешать раствор в лунках, осторожно покачивая планшет вручную в течение 1 минуты.

13.8 Закрывать планшет крышкой (фольгой или липкой пленкой) и инкубировать в течение 45 минут при комнатной температуре.

13.9 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.12.2.3). 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.

13.10 Во все используемые лунки вносят по 100 мкл раствора конъюгата. Планшет закрывают крышкой (фольгой или липкой пленкой) и инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре.

13.11 После инкубации процедуру промывки лунок повторяют как описано в п.13.9.

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

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

14 Учет и интерпретация результатов

14.1 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).

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

14.3 Рассчитывают процент позитивности (ПП) всех образцов и ОП₄₅₀K⁻_{cp} относительно ОП₄₅₀K⁺_{cp}, по следующей формуле:

$$\text{ПП} = \frac{\text{ОП}_{450\text{пробы}}}{\text{ОП}_{450\text{K}_{cp}^{+}}} \times 100 \%$$

Результаты считаются достоверными и могут быть учтены, если:

ПП для ОП₄₅₀K⁻_{cp} < 40%;

ОП₄₅₀K⁺_{cp} ≥ 0,5.

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

14.4 Результат анализа проб сывороток (плазмы) крови свиней со значениями ПП <40% считают отрицательным (антитела к вирусу КЧС отсутствуют), ПП ≥40 % - результат положительный (в исследуемом образце присутствуют антитела к вирусу КЧС).

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

IV. Меры личной профилактики

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

16 Все работы необходимо проводить в соответствующей спецодежде с

обязательным использованием средств индивидуальной защиты. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

17 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.