

Утверждаю

Врио директора

ФКП «Курская биофабрика»

С.А. Шеметюк

«5» апреля 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

Организация-разработчик: Федеральное казенное предприятие
«Курская биофабрика – фирма «БИОК»
(ФКП «Курская биофабрика»), 305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5

I Общие сведения

1. Торговое наименование: набор для выявления антител к вирусу классической чумы свиней иммуноферментным методом (далее – набор).

Международное непатентованное наименование: набор для выявления антител к вирусу классической чумы свиней (КЧС) иммуноферментным методом.

2. В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

К1 – полистироловый 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа с иммобилизованным в лунках антигеном вируса классической чумы свиней – 1 планшет;

К2 – сыворотка крови, содержащая антитела к вирусу классической чумы свиней (положительный контроль), цельная, 0,1 см³ – 1 флакон;

К3 – сыворотка крови, не содержащая антител к вирусу классической чумы свиней (отрицательный контроль), цельная, 0,1 см³ – 1 флакон;

К4 – антивидовой конъюгат (моноклональные антитела к IgG свиньи, меченные пероксидазой), концентрированный, 0,25 см³ – 1 флакон;

К5 – концентрат (× 20) буферного раствора для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата, 5 см³ – 1 флакон;

К6 – концентрат (× 20) промывочного буферного раствора, 20 см³ – 1 флакон;

К7 – раствор субстрата (H2O2), 22 см³ – 1 флакон;

К8 – раствор хромогена (ТМБ), 0,6 см³ – 1 флакон;

К9 – стоп-раствор (1 М раствор фосфорной кислоты), 10 см³ – 1 флакон.

Набор рассчитан на анализ 92 проб.

3. Компонент № 1 – полистироловый 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа с иммобилизованным в лунках антигеном вируса классической чумы свиней;

компонент № 2 – прозрачная жидкость соломенно-жёлтого или красноватого цвета;

компонент № 3 – прозрачная жидкость соломенно-жёлтого или красноватого цвета;

компонент № 4 – жидкость розового цвета;

компонент № 5 – жидкость желтого или оранжево-красного цвета, допускается расслоение;

компонент № 6 – прозрачная бесцветная жидкость;

компонент № 7 – прозрачная бесцветная жидкость;

компонент № 8 – прозрачная бесцветная жидкость;

компонент № 9 – прозрачная бесцветная жидкость.

Компонент № 1 упакован в индивидуальный маркированный пакет с влагопоглотителем. Остальные компоненты набора расфасованы в маркированные флаконы из непрозрачного полиэтилена соответствующей вместимости, с завинчивающимися пробками.

В каждую коробку вложена инструкция по применению набора.

Срок годности компонентов набора – 12 месяцев от даты изготовления.

Набор после вскрытия можно использовать в течение 30 суток при соблюдении условий хранения.

По истечении срока годности набор не должен применяться.

4. Препарат выпускают в виде набора компонентов и рассчитан на анализ 92 проб сывороток крови при единовременном использовании. Комплектация набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения исследований в разное время по мере поступления биологического материала, в этом случае количество анализируемых проб уменьшается на количество контрольных проб при проведении каждого анализа.

5. Хранить набор в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается транспортирование набора всеми видами крытого транспорта в упаковке производителя в условиях, исключающих замораживание, при температуре до 25 °С, в течение не более 15 суток.

Не допускается замораживание компонентов!

6. Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

7. При нарушении целостности и укупорки флаконов, упаковки полистироловых планшетов и пакетов, изменении цвета компонентов, наличии посторонней примеси, при отсутствии этикеток, а также по истечении срока годности набор выбраковывают, иммуноспецифические компоненты инактивируют кипячением в течение 15 мин. Неиспользованные планшеты дезинфицируют в 3 % растворе хлорамина и утилизируют любым доступным, разрешенным методом. Утилизация неспецифических компонентов наборов не требует специальных мер безопасности.

8. Отпускается без рецепта.

II Биологические свойства

9. Набор относится к диагностическим препаратам для ветеринарного применения.

10. У зараженной или вакцинированной против вируса КЧС свиньи вырабатываются специфические антитела, которые можно выявить в сыворотке крови иммуноферментным анализом (ИФА).

Принцип непрямого варианта иммуноферментного анализа заключается в выявлении комплекса, образованного антигеном, иммобилизованным с помощью моноклональных антител на поверхности лунок полистиролового планшета, и специфическими антителами, содержащимися в пробах сыворотки крови свиней. Специфический комплекс взаимодействует с антивидовым конъюгатом моноклональных антител к IgG свиньи с пероксидазой и обнаруживается по изменению окраски раствора в результате химических превращений субстрата и хромогена. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе.

III Порядок применения

11. Набор предназначен для выявления специфических антител к вирусу КЧС в сыворотке крови свиней для оценки напряженности и длительности поствакцинального иммунитета у вакцинированных свиней и для диагностики КЧС у не вакцинированных.

12. Запрещается применять для проведения других исследований.

13. Работы с набором должны проводиться в специально оборудованном помещении с соблюдением правил предосторожности и личной гигиены с использованием средств индивидуальной защиты. При соблюдении указанных правил использования набор не представляет опасности для здоровья человека. Меры личной профилактики при проведении диагностических исследований с использованием сывороток сводится к соблюдению санитарно-эпидемиологических правил и техники безопасности при работе с биологическим материалом.

Все лица, участвующие в исследовании, должны быть одеты в спецодежду и спецобувь. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

14. В случае попадания компонентов набора или исследуемого материала на открытые участки тела или слизистые оболочки, их смывают проточной водопроводной водой.

15. Проведение исследования.

15.1. Материалом для исследования служат индивидуальные пробы сыворотки крови свиней.

Для исследования используют сыворотки крови свиней без признаков гемолиза и бактериальной контаминации, объемом не менее 0,5 см³. Допускается хранение образцов сыворотки при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 72 ч или при температуре не выше минус 20 °С в течение 60 суток после их получения. Размораживать образцы сыворотки крови необходимо в водяной бане при температуре (37,0 ± 0,5) °С. Не рекомендуется многократное замораживание и оттаивание образцов.

15.2. Для проведения ИФА требуются одно- и восьмиканальные пипетки переменного объема до 0,01; 0,20; 1,0; 5,0 и 10,0 см³ со сменными наконечниками, мерная лабораторная посуда, термостат с температурой нагрева

($37,0 \pm 0,5$) °С, дистиллированная вода, бытовой холодильник, центрифуга, фильтровальная бумага, контейнер, система промывания планшетов, которая распределяет по $0,3 \text{ см}^3$ раствора в лунку, спектрофотометр (ридер) для микропланшетов любой модели с фильтром на 450 нм для учёта результатов ИФА.

15.3. Перед началом работы набор выдерживают 25-30 мин при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С. Сразу после проведения анализа неиспользованные компоненты убирают в холодильник с температурой от 2 °С до 8 °С.

15.4. Перед началом работы составляют план проведения исследования.

15.5. Подготовка рабочих растворов.

15.5.1. Буферный рабочий раствор для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата. Компонент № 5 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают (например, для получения 50 см^3 буферного раствора к $2,5 \text{ см}^3$ концентрата добавляют $47,5 \text{ см}^3$ дистиллированной воды). После разведения буфер приобретает светло-розовый цвет. Буферный рабочий раствор можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 5 суток.

15.5.2. Промывочный буферный рабочий раствор. Компонент № 6 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают (например, для получения 200 см^3 промывочного буферного рабочего раствора к 10 см^3 концентрата добавляют 190 см^3 дистиллированной воды). После разведения промывочный буферный рабочий раствор можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 5 суток.

15.5.3. Рабочий раствор конъюгата. Компонент № 4 разбавляют буферным рабочим раствором для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата согласно концентрации, указанной на этикетке. Например, имея 40-кратный концентрат, в расчёте на один планшет, к $10,0 \text{ см}^3$ буферного рабочего раствора добавляют $0,25 \text{ см}^3$ компонента № 4. Рабочий раствор конъюгата хранить нельзя.

15.5.4. Субстратная смесь. Субстратную смесь изготавливают после завершения промывания лунок. Для приготовления 10 см^3 раствора субстратной смеси, необходимого для проведения реакции на одном планшете, смешивают $10,0 \text{ см}^3$ раствора компонента № 7 и $0,25 \text{ см}^3$ раствора компонента № 8. Подготовленный раствор субстратной смеси должен быть бесцветным и стабильным в течение 15 мин. Раствор субстратной смеси с изменённым цветом не используют.

15.5.5. Компонент набора № 9 (стоп-раствор) не требует предварительной подготовки.

15.6. Постановка реакции.

15.6.1. Из комплекта набора берут пакет с планшетом (компонент № 1), в лунках которого иммобилизован типоспецифический антиген вируса КЧС. При необходимости отбирают требуемое количество стрипов, помещают в рамку-держатель и маркируют водостойким маркером из-за возможного выпадения их из рамки во время проведения исследования. Неиспользованные стрипы

помещают в пакет с влагопоглотителем и хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С. Неиспользуемые лунки цельного планшета можно сохранить для дальнейшего использования, если немедленно заклеить их герметичной водонепроницаемой плёнкой. Компонент № 1 (планшет) используют однократно.

15.6.2. Внесение испытуемых проб

Наслаивание сывороток. Сыворотки крови животных исследуют в разведении 1:5 в буферном рабочем растворе для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата. Все контрольные и испытуемые пробы сывороток разводят непосредственно в лунках планшета. **Необходимо тщательное перемешивание сывороток в лунках.**

В лунки стрипов полистиролового планшета в соответствии с подготовленным планом исследования вносят по 0,08 см³ буферного рабочего раствора для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата, подготовленного согласно п. 15.5.1.

Внесение контролей:

- в лунки А1 и В1 полистиролового планшета вносят по 0,020 см³ компонента № 2 (положительного контроля);
- в лунки С1 и D1 полистиролового планшета вносят по 0,020 см³ компонента № 3 (отрицательного контроля).

Внесение контролей в лунки А1 – D1 не обязательно, они могут быть внесены в другие лунки планшета.

В остальные лунки полистиролового планшета вносят по 0,020 см³ испытуемых проб сывороток крови.

Для внесения каждой пробы сыворотки крови используют новый наконечник.

Для повышения достоверности результатов рекомендуется внесение проб испытуемых сывороток в двух повторностях.

Внимание! Для контрольных образцов (компонентов №№ 2 – 3) постановка в двух повторностях обязательна.

15.6.3. Полистироловый планшет закрывают крышкой и инкубируют 1 ч (± 5 мин) при температуре (37,0 \pm 0,5) °С.

15.6.4. Промывание лунок планшетов.

Содержимое лунок полистиролового планшета удаляют, используя автоматические или ручные промывающие системы, допускается вытряхивание. Все лунки планшета промывают 3 раза промывочным буферным рабочим раствором, подготовленным по п. 15.5.2 (по 0,25-0,3 см³ в каждую лунку), затем раствор удаляют. Во время обработки большого количества планшетов (с целью синхронизации этапов) можно оставлять планшеты с промывочным буферным рабочим раствором до 20 мин.

После последнего промывания необходимо осторожно постучать планшетом по впитывающему материалу (фильтровальной бумаге) с целью полного удаления содержимого лунок.

15.6.5. Внесение конъюгата.

В каждую лунку планшета вносят по 0,1 см³ рабочего раствора конъюгата, подготовленного согласно п. 15.5.3. Планшет закрывают крышкой (или плёнкой) и инкубируют 1 ч (± 5 мин) при температуре ($37,0 \pm 0,5$) °С.

15.6.6. Промывание лунок планшета.

Четырёхкратно проводят процедуру промывания лунок планшета, описанную в п. 15.6.4.

15.6.7. Обнаружение (внесение субстратного раствора).

В каждую лунку полистиролового планшета вносят по 0,1 см³ субстратного раствора, подготовленного согласно п. 15.5.4. Вносить раствор необходимо аккуратно, не касаясь лунок планшета.

Планшет закрывают крышкой и инкубируют при температуре от 18 °С до 24 °С в защищённом от прямых солнечных лучей месте от 1 мин до 5 мин до проявления ярко выраженного синего окрашивания в лунках с положительными контролями.

15.6.8. Остановка реакции.

В каждую используемую лунку полистиролового планшета вносят по 0,08 см³ компонента № 9 (стоп-раствора). Не допускается контакт наконечника, содержащего стоп-раствор, с содержимым лунки, так как перенос окрашенного раствора из лунки в лунку или резервуар с раствором может исказить результаты. Тщательно вытирают наружную нижнюю поверхность планшета.

15.6.9. Учёт реакции.

Результаты анализа учитывают инструментальным способом, используя спектрофотометр (ридер) для микропланшетов с вертикальным лучом света. Сразу после остановки реакции измеряют в двухволновом режиме 450 нм относительно 630 нм оптическую плотность (ОП) продуктов реакции в каждой лунке.

15.7. Оценка результатов реакции.

15.7.1. Оценивают величины оптической плотности, полученные в реакциях с контрольными компонентами №№ 2 – 3:

результаты считают достоверными, если контрольные показатели соответствуют критериям:

– среднее значение ОП, полученное в реакции с положительным контролем должно быть не ниже 0,500 оптических единиц (опт. ед.) для компонента № 2: $ОП^+ \geq 0,500$.

– коэффициент ПП для отрицательного контроля (компонента № 3) рассчитывается по формуле:

$$ПП^- = \frac{ОП^-}{ОП_{сп}^+} * 100\% ;$$

$$ПП^- < 40\% .$$

15.7.2. Если значения величин оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами №№ 2 – 3, не соответствуют указанным критериям, результаты считаются недостоверными и исследование проводят повторно.

15.7.3. Если отношения величин оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами №№ 2 – 3, соответствуют вышеуказанным критериям,

то проводят оценку результатов реакций в лунках с испытуемыми пробами сыворотки.

15.7.4. Оценка результатов реакции испытуемых проб проводят по величине коэффициента (ПП), который рассчитывают по формуле:

$$ПП = \frac{ОП_{пробы}}{ОП_{ср}} * 100 \%$$

Реакцию считают **положительной** для проб сыворотки крови, если значение ПП $\geq 40 \%$,

Реакцию считают **отрицательной** для проб сыворотки крови, если значение ПП $< 40 \%$.

15.8 Интерпретация результатов.

Выявление положительной реакции в исследуемых сыворотках указывает на наличие специфических антител к вирусу КЧС.

16. Постановку иммуноферментного анализа проводят «in vitro» и исследование на организм свиней влияния не оказывает.

17. Особенности проявления реакции при соблюдении техники ее постановки не установлено.

18. Взаимодействия с другими лекарственными препаратами не может происходить, так как компоненты набора не контактируют с организмом свиньи.

19. Несоблюдение методики постановки реакции может привести к ошибочным результатам.

20. Препарат не оказывает действия на продукцию убоя сельскохозяйственных животных и ее используют в соответствии с действующими правилами ветеринарно-санитарной экспертизы.

Наименование и адрес производственной площадки производителя лекарственного препарата для ветеринарного применения:

ФКП «Курская биофабрика», 305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5.

Наименование и адрес организации, уполномоченной на принятие претензий от потребителя:

ФКП «Курская биофабрика», 305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5.

