УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»
_____ А.В. Кривонос
«1» октября 2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антител к антигену gB вируса болезни Ауески иммуноферментным методом «Ауески gB-СЕРОТЕСТ»

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

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к антигену gB вируса болезни Ауески (ВБА) иммуноферментным методом «Ауески gB-СЕРОТЕСТ».

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

1) Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках **гликопротеином gB ВБА** - 2 штуки;

2) Положительный контроль **(К+),** прозрачная жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, 2 мл - 1 флакон;

3) Отрицательный контроль **(К-),** прозрачная жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, 2 мл - 1 флакон;

4) Моноклональные антитела к антигену gB ВБА, меченные пероксидазой хрена **(Конъюгат),** прозрачная жидкость от голубого до синего цвета, 25 мл - 1 флакон;

5) 20-кратный концентрат буферного раствора для промывки планшетов и разведения сывороток (**ФСБТ**), бесцветная прозрачная жидкость, 25 мл - 4 флакона;

6) Субстратный раствор с хромогеном **(СР),** бесцветная прозрачная жидкость, 25 мл - 1 флакон;

7) Стоп-раствор, бесцветная прозрачная жидкость, 25мл - 1 флакон.

3. Набор «Ауески gB-СЕРОТЕСТ» предназначен для выявления специфических антител к антигену gB вируса болезни Ауески иммуноферментным методом (ИФА) в сыворотке крови больных, подозреваемых на заболевание, экспериментально зараженных и вакцинированных свиней.

Набор рассчитан на проведение на одном планшете одновременного анализа 92 проб сыворотки (в одном повторе) или 46 проб (в 2 повторах) и двух контрольных проб (в 2 повторах).

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

4. **Упаковка, маркировка**

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

Пластиковые флаконы (пробирки) укупоривают завинчивающимися или защелкивающимися пластиковыми крышками. Стеклянные 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 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°С. Не допускается замораживание компонентов набора (за исключением сывороток)! Запрещается смешивать компоненты наборов разных серий, переливать в другую посуду и использовать набор по истечении срока годности.

Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

При нарушении целостности и укупорки флаконов, упаковки планшетов, изменении цвета и консистенции содержимого, наличии плесени или других примесей, при отсутствии этикеток, а также в случае не использования в пределах срока годности, компоненты набора подлежат выбраковке. Иммуноспецифические компоненты и не использованные планшеты дезинфицируют в 3% растворе хлорамина. Химические компоненты не требуют специальных мер утилизации.

ПРИМЕЧАНИЕ. Для проведения ИФА используют: одно- и многоканальные микропипетки переменных объемов со сменными наконечниками, мерную лабораторную посуду, дистиллированную или деионизованную воду, суховоздушный термостат с температурой 37°С, спектрофотометр с вертикальным лучом света длиной волны 450 нм, липкую пленку.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

6. Метод основан на конкурентном взаимодействии меченных пероксидазой хрена моноклональных антител к гликопротеину gB ВБА (конъюгат) и сывороточных специфических антител с иммобилизованным в лунках планшета гликопротеином gB ВБА.

При отсутствии в исследуемой сыворотке специфических антител, конъюгат свободно взаимодействует с иммобилизованным на планшете гликопротеином gB ВБА и, после добавления хромоген-субстратного раствора, в лунке развивается окраска.

Если исследуемая сыворотка содержит вирусспецифические антитела, происходит их взаимодействие с иммобилизованным в лунках гликопротеином gB ВБА, его частичная или полная блокировка. В результате чего связывание конъюгата с антигеном, иммобилизованном на планшете, 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

7. **Подготовка к исследованиям**

7.1.*Подготовка биологического материала*

Для анализа используют сыворотку крови свиней. Если анализ проводят в течение 24 ч после отбора, образцы биоматериала хранят при температуре 4°С. При длительном хранении образцы замораживают при температуре минус 20°С. Перед использованием замороженные образцы в течение 5-10 мин нагревают на водяной бане при температуре 37°С.

В случае выпадения осадка в пробах сыворотки крови их обязательно осветляют

центрифугированием в течение 10 мин при 2000g.

Не рекомендуется исследование проросших и гемолизированных проб, а также многократное замораживание и оттаивание образцов сыворотки крови.

7.2. *Подготовка рабочих растворов*

7.2.1. Перед началом работы все реагенты выдерживают 30 мин при комнатной температуре (20-25°С).

ВНИМАНИЕ. При неоднократном использовании компонентов набора контрольные сыворотки рекомендуется расфасовать по 200 мкл в отдельные пробирки типа Эппендорф и хранить до следующего анализа при температуре минус 20°С. Другие компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя.

7.2.2. Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов и разведения сывороток **(ФСБТ).** Содержимое флакона № 5 разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой. (Пример: для получения 500 мл рабочего раствора к 25 мл концентрата добавляют 475 мл воды). Следует иметь в виду, что для промывания одного стрипа требуется примерно 30 мл рабочего раствора. Рабочий раствор стабилен при температуре 4°С в течение 3 сут. Для более длительного хранения раствор замораживают и хранят при температуре минус 20° С.

7.2.3. Остальные компоненты набора: положительный контроль (флакон №2), отрицательный контроль (флакон №3), раствор конъюгата (флакон № 4), субстратный раствор (флакон №6) и стоп-раствор (флакон №7) - готовы к применению.

8. **Проведение анализа**

8.1. В лунки планшета (по количеству исследуемых проб + 4 лунки для контролей) вносят по 20 мкл рабочего раствора ФСБТ. В лунки А1-В1 и С1-D1 вносят по 80 мкл контрольных проб ($К^+$, $К^-$). В остальные лунки вносят по 80 мкл исследуемых сывороток. После внесения образцов содержимое лунок тщательно перемешивают пипетированием. Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 ч при температуре 37°С.

8.2. Планшет 3 раза промывают рабочим раствором ФСБТ на автоматическом промывающем устройстве или вручную, каждый раз доверху заполняя лунки (по 300 мкл на лунку) и затем полностью удаляя жидкость постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

ВНИМАНИЕ. При этой операции возможно выпадение стрипов из рамки! Рекомендуется перед началом работы стрипы промаркировать.

8.3. В каждую лунку вносят по 100 мкл конъюгата.

Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 30 мин при температуре 37°С.

8.4. Планшет 5 раз промывают рабочим раствором ФСБТ (см. этап 8.2).

8.5.В каждую лунку вносят по 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Планшет инкубируют 10 минут при комнатной температуре в темном месте. Останавливают реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора.

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

9. Учет и интерпретация результатов

9.1.Вычисляют среднее арифметическое значение A_{450} отрицательного и положительного контролей ($A_{450}К^-$ и A_{450} $\mathbf{К^+}$) и каждой опытной пробы (A_{450}ОП), если пробу исследовали в двух повторах.

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

$$\mathbf{A_{450}К^- > 0.8}$$
$$\mathbf{A_{450}\,К^+ < 0.3}$$

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют. Если A_{450}

отрицательного и положительного контролей соответствуют вышеуказанным критериям, далее проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

9.2. Вычисляют отсекающее значение ***(Cut off),*** необходимое для правильной интерпретации результатов.

$$\textbf{\textit{Cut off}} = \mathbf{A_{450}K^{-}\ x\ 0.7}$$

Пробу считают положительной, если значение $\mathbf{A_{450}ОП}$ ниже ***Cut off.***
Пробу считают отрицательной, если $\mathbf{A_{450}ОП}$ выше ***Cut off.***

Пример расчета содержания антител к антигену gB ВБА в опытных пробах.

Средние значения оптической плотности контрольных проб: $A_{450}K^{-} = 1,360$ и A450 $K^{+} = 0,110$ - соответствуют требуемым критериям, т.е. $A_{450}oK^{-} > 0,8$ и $A_{450}K^{+} < 0,3$.

Cut off *=1,360 x 0,7 = 0,952*

A_{450} опытных проб: $A_{450}ОП$ №1 = 0,263 и $A_{450}ОП$ №2 = 1,725

Интерпретация результатов:

Исследуемая проба сыворотки крови №1 содержит антитела к gB ВБА (положительная реакция), поскольку показатель $A_{450}ОП$ №1 < 0,952 (Cut off), что свидетельствует об инфицировании животного ВБА или о проведенной вакцинации любым типом вакцин. В сыворотке крови №2 специфических антител нет (отрицательная реакция), поскольку показатель $A_{450}ОП$ №2 > 0,952 (Cut off). В этом случае животное считается серонегативным по болезни Ауески.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

10. 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» совместно с фирмой INGENASA (Испания). Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16.