



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антител
к вирусу репродуктивного и респираторного синдрома свиней
иммуноферментным методом
«РРСС-СЕРОТЕСТ плюс»
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к вирусу репродуктивного и респираторного синдрома свиней иммуноферментным методом «РРСС-СЕРОТЕСТ плюс».

2. В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

- 1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках рекомбинантным антигеном вируса РРСС – 2 штуки;
- 2). Положительный контроль (K^+), бесцветная или с желтоватым оттенком прозрачная жидкость, $2,0 \text{ см}^3$ – 1 флакон;
- 3). Отрицательный контроль (K^-), бесцветная или с желтоватым оттенком прозрачная жидкость, $2,0 \text{ см}^3$ – 1 флакон;
- 4). Антитела к IgG свиньи, меченные пероксидазой хрена, 100-кратный концентрат (**Конъюгат**), бесцветная прозрачная жидкость, $0,35 \text{ см}^3$ – 1 пробирка;
- 5). 20-кратный концентрат буферного раствора для промывки планшетов (**ФСБТ**), бесцветная прозрачная жидкость, $25,0 \text{ см}^3$ – 3 флакона;
- 6). Буфер для разведения сывороток (**БР**), бесцветная прозрачная жидкость, $25,0 \text{ см}^3$ – 2 флакона;
- 7). Субстратный раствор (**СР**), бесцветная прозрачная жидкость, $6,5 \text{ см}^3$ – 1 флакон;
- 8). Буфер для разведения субстрата (**БРС**), бесцветная прозрачная жидкость, $30,0 \text{ см}^3$ – 1 флакон;
- 9). **Стоп-раствор**, бесцветная прозрачная жидкость, $25,0 \text{ см}^3$ – 1 флакон.

3. Набор «РРСС-СЕРОТЕСТ плюс» предназначен для выявления и определения титра антител к вирусу репродуктивного и респираторного синдрома свиней (РРСС) в сыворотке крови свиней иммуноферментным методом.

Набор рассчитан на проведение на одном планшете одновременного анализа 46 исследуемых проб сыворотки крови и двух контрольных проб (в двух 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 укупоренные флаконы (пробирки) соответствующей вместимости.

Пластиковые флаконы (пробирки) укупоривают завинчивающимися или защелкивающимися пластиковыми крышками. Стеклоянные 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 и разработчика, 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 и разработчика, 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 и разработчика, полное название набора, номер серии и номер контроля, дату изготовления (месяц и год), срок годности (месяц и год), условия хранения, регистрационный номер, знак соответствия в системе ГОСТ Р, обозначение нормативного документа, надпись «для животных». 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 набора (за исключением сывороток)! Запрещается смешивать компоненты наборов разных серий, переливать в другую посуду и использовать набор по истечении срока годности.

Флаконы без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии плесени или других примесей и не использованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Планшеты и контрольные сыворотки обеззараживают 3% раствором хлорамина. Остальные компоненты набора 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°C, спектрофотометр с вертикальным лучом света длиной волны 405 нм, липкую пленку.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

6. Метод основан на взаимодействии иммобилизованного на поверхности лунок рекомбинантного ORF7 антигена вируса РРСС (Американский и Европейский изоляты) со специфическими антителами из исследуемой пробы сыворотки крови и последующим выявлении полученного иммунного комплекса конъюгатом (меченные пероксидазой хрена моноклональные антитела к IgG свиньи). Связанная пероксидаза вызывает разложение находящейся в субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антител в определяемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

7. 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. При более длительном хранении образцы замораживают при температуре минус 20°C. Перед исследованием замороженные образцы в течение 5-10 мин нагревают в водяной бане при температуре 37°C. В случае выпадения осадка в пробах, их обязательно осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 2000g.

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

8. Подготовка рабочих растворов

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

8.2. Рабочий раствор буфера для промывания планшетов (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. При использовании части компонентов следует иметь в виду, что для обработки одного стрипа требуется примерно 30 мл рабочего раствора ФСБТ. Рабочий раствор стабилен при температуре 4⁰С в течение 3 сут. Для более длительного хранения раствор замораживают и хранят при температуре минус 20⁰С.

8.3. Рабочий раствор **конъюгата**. Содержимое флакона № 4 разводят в 100 раз рабочим раствором буфера для промывания планшетов (ФСБТ). Пример: для приготовления 10 мл рабочего раствора конъюгата к 100 мкл концентрата добавляют 9,9 мл ФСБТ.

8.4. Рабочий раствор субстрата (**СР**). Содержимое флакона № 7 разводят в 10 раз буфером для разведения субстрата (БРС, флакон 8). Пример: для приготовления 10 мл рабочего раствора субстрата к 1 мл концентрата добавляют 9 мл БРС.

8.5. Положительный контроль (**К⁺**, флакон № 2), отрицательный контроль (**К⁻**, флакон № 3), буфер для разведения сывороток (**БР**, флакон №6), буфер для разведения субстрата (**БРС**, флакон № 8) и **стоп-раствор** (флакон №9) - готовы к использованию.

ВНИМАНИЕ. Стоп-раствор при хранении при температуре 4⁰С может выпадать в осадок. Для полного растворения осадка рекомендуется нагреть раствор до 37⁰С непосредственно перед использованием.

При неоднократном использовании компонентов набора контрольные сыворотки рекомендуется расфасовать по 250 мкл в отдельные пробирки типа Эппендорф и хранить до следующего анализа при температуре минус 20⁰С.

Остальные компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в заводской упаковке.

9. Проведение анализа

9.1 Исследуемые **сыворотки** крови разводят в **100 раз БР**. Пример: для получения 300 мкл пробы сыворотки для анализа к 3 мкл сыворотки добавляют 297 мкл БР.

9.2. В лунки **A1-B1** и **C1-D1** вносят по **100 мкл** контрольных проб (**К⁺** и **К⁻**).

9.3. В остальные лунки планшета вносят по **100 мкл** разведенных исследуемых сывороток (по две лунки на каждый образец сыворотки).

9.4. Закрывают планшет липкой пленкой и инкубируют **1 ч при 37⁰С**.

9.5. Планшет **4 раза** промывают рабочим раствором **ФСБТ**, подготовленным по п. 8.2., на автоматическом промывочном устройстве или вручную, доверху заполняя лунки (300 мкл/лунку), каждый раз полностью удаляя жидкость постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

ВНИМАНИЕ. При этой операции возможно выпадение стрипов из рамки! Рекомендуется до начала работы промаркировать стрипы для восстановления их первоначального расположения.

9.6. В каждую лунку вносят по **100 мкл** рабочего раствора **конъюгата** (см. п.8.3.).

9.7. Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют **45 мин** при комнатной температуре (20-25⁰С).

9.8. Планшет **5 раз** промывают рабочим раствором **ФСБТ** (см. п. 9.5).

9.9. В каждую лунку вносят по **100 мкл** рабочего раствора субстрата (**СР**), подготовленного по п. 8.4.

9.10. Планшет инкубируют **15 мин** при комнатной температуре в темном месте.

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

9.12. После остановки реакции оптическую плотность субстратной смеси измеряют на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны **405 нм (A₄₀₅)**.

10. Учет и интерпретация результатов

10.1. На первом этапе проводят оценку **A₄₀₅** отрицательного и положительного контролей, входящих в состав набора. Результаты реакции считаются достоверными и могут быть учтены, если контрольные показатели соответствуют следующим критериям:

A₄₀₅ отрицательного контроля (**A₄₀₅ К⁻**) < 0,25

A_{405} положительного контроля ($A_{405} K^+$) $> 1,0$

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считаются недостоверными и реакцию повторяют. Если A_{405} отрицательного и положительного контролей соответствуют вышеуказанным критериям, то далее проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

10.2. Вычисляют отсекающее значение (*Cut off*), необходимое для правильной интерпретации результатов анализа испытуемых проб:

$$Cut\ off = A_{405} K^+ \times 0,15;$$

10.3. Вычисляют среднее значение A_{405} для каждой опытной пробы ($A_{405} ОП_{ср}$).

10.4. Проводят интерпретацию полученных результатов:

Пробу считают положительной, если ($A_{405} ОП_{ср}$) выше, чем *Cut off*.

Пробу считают отрицательной, если ($A_{405} ОП_{ср}$) ниже, чем *Cut off*.

10.5. Для определения титра антител в положительных образцах используют следующую формулу:

$$Титр = 100 \times (2,718^{4x}) - 80,$$

где 2,718 – значение *e* (основание натурального логарифма или число Эйлера), а

$$x = A_{405} ОП_{ср} / A_{405} K^+$$

Пример расчета вычислений:

$$A_{405} K^+ = 2,343$$

$$A_{405} K = 0,182$$

$$Cut\ off = 2,343 \times 0,15 = 0,351$$

$$A_{405} ОП_{ср} = 0,910 \text{ (проба положительная)}$$

Расчет титра антител в пробе:

$$x = 0,910 / 2,343 = 0,3884$$

$$Титр = 100 \times (2,718^{4 \times 0,3884}) - 80 = 393$$

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

11. Работу с компонентами набора следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. При попадании их на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды

12. Запрещается прием пищи и воды, курение в помещении, где проводятся работы с компонентами набора.

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

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

С утверждением настоящей инструкции утрачивает силу инструкция по применению набора для выявления антител к вирусу репродуктивного и респираторного синдрома свиней иммуноферментным методом «РССС-СЕРОТЕСТ плюс», утвержденная Россельхознадзором 26. 06. 2008 г.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ ВГНКИ

Регистрационный номер ПВР-1-3.8/02158