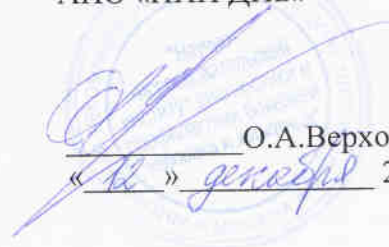


СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУ
«Всероссийский государственный
Центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных
и кормов»; Председатель ТК 454

« » 20 г.
А.Н.Панин



УТВЕРЖДАЮ
Президент
АНО «НИИ ДПБ»



« » декабрь 20 г.
О.А.Верховский

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора
для выявления вируса африканской чумы свиней (АЧС) иммуноферментным методом
«АЧС-ИФА»
(организация-разработчик – АНО «НИИ ДПБ», г. Москва)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления вируса африканской чумы свиней (АЧС) иммуноферментным методом «АЧС-ИФА».

2. Состав набора и внешний вид компонентов:

1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированными в лунках **моноклональными антителами к белку VP 73 вируса АЧС** - 1 штука.

2). Положительный контроль (**К+**) – рекомбинантный белок VP 73 вируса АЧС, жидкость от розового до красного цвета, 1,0 см³ -1 флакон.

3). Отрицательный контроль (**К-**) - буферный раствор, не содержащий антиген вируса АЧС, жидкость от голубого до синего цвета, 1,0 см³ - 1 флакон.

4). 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с Твином 20 для промывания планшетов (**ФСБТ**), прозрачная жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, 25,0 см³ - 2 флакона.

5). Буфер для разведения образцов и конъюгата (**БР**), жидкость розового цвета, 25,0 см³ - 1 флакон.

6). **Конъюгат** - моноклональные антитела к белку VP 73 вируса АЧС, меченные пероксидазой хрена, 50-кратный концентрат, прозрачная жидкость зеленого цвета, 0,3 см³ - 1 флакон;

7). Субстратный раствор с перекисью водорода для разведения хромогена (**СР**), бесцветная прозрачная жидкость, 5,1 см³ -1 флакон.

8). Хромоген, тетраметилбензидин (**ТМБ**), бесцветная прозрачная жидкость, 5,1 см³ - 1 флакон.

9). 1 М серная кислота (**Стоп-раствор**), бесцветная прозрачная жидкость, 5,1 см³ - 1 флакон.

3. Набор предназначен для выявления антигена возбудителя АЧС в крови и органах больных и павших от АЧС животных.

Набор рассчитан на проведение одновременного анализа 46 исследуемых проб биоматериала (в 2 повторях) и контрольных проб (в 2 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. Стеклоаные 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, 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°C. Не допускается замораживание компонентов набора.

Не использовать набор по истечении срока годности.

Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Флаконы без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии других примесей и не использованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Планшеты и контрольные образцы обеззараживают 3% раствором хлорамина или другими сильными окислителями. Остальные компоненты набора не требуют специальных мер утилизации.

6. Для проведения ИФА необходимы: одно- и многоканальные микропипетки переменных объемов со сменными наконечниками, мерная лабораторная посуда, дистиллированная или деионизованная вода, суховоздушный термостат с температурой 37°C, спектрофотометр с вертикальным лучом света длиной волны 450 нм.

ВНИМАНИЕ! Компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя при температуре от 2 до 8°C. Не переливать в другую посуду! Не смешивать компоненты из наборов разных серий!

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

7. Специфические моноклональные антитела к белку VP 73 вируса АЧС, адсорбированные в лунках иммунологического планшета, образуют комплекс с антигеном вируса АЧС, содержащимся в пробе. Образующийся комплекс взаимодействует с конъюгатом (меченые пероксидазой хрена моноклональные антитела к белку VP 73 вируса АЧС). Связанная пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антигена в определяемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Подготовка к исследованию

8.1. Подготовка биологического материала

Для анализа используют цельную кровь, сыворотку, кусочки (массой 5-10 г) внутренних органов (селезенка, лимфатические узлы). Образцы патматериала можно хранить при температуре 4°C не более 3-х суток, при температуре минус 20°C – до 50-60 суток.

Пробы крови и сыворотки разводят 1:1 буфером для разведения (БР, флакон №5) и используют для ИФА.

Из проб селезенки или лимфатических узлов готовят 10% суспензию на забуференном физрастворе (в набор не входит), центрифугируют в течение 1 мин при 3000g. Полученный супернатант разводят 1:1 буфером для разведения (БР, флакон №5) и используют для ИФА.

Многократное замораживание и оттаивание образцов крови и органов не допускается.

8.2. Подготовка рабочих растворов

8.2.1. Перед началом работы все реагенты выдерживают не менее 0,5 ч при комнатной температуре (20-25⁰С) и перемешивают.

8.2.2. *Рабочий раствор буфера для промывания планшетов (ФСБТ)*. Содержимое флакона № 4 разводят в 20 раз дистиллированной водой. (Пример: для получения 500 мл рабочего раствора к 25 мл концентрата добавляют 475 мл воды). Следует иметь в виду, что для обработки одного стрипа требуется примерно 30 мл рабочего раствора. Рабочий раствор стабилен при температуре 4⁰С в течение 3 сут. Для более длительного хранения раствор замораживают и хранят при минус 20⁰С.

8.2.3. *Рабочий раствор конъюгата*. Конъюгат (флакон № 6) разводят в 50 раз буфером для разведения образцов и конъюгата (БР, флакон № 5). (Пример: для получения 5 мл рабочего раствора к 0,1 мл Конъюгата добавляют 4,9 мл БР). Раствор готовят непосредственно перед использованием.

8.2.4. *Рабочий хромоген-субстратный раствор*. Раствор хромогена (ТМБ - флакон № 8) разводят субстратным раствором (СР, флакон № 7) в соотношении 1: 1 и перемешивают. (Пример: для получения 2 мл рабочего хромоген-субстратного раствора к 1 мл ТМБ добавляют 1 мл СР). Раствор готовят непосредственно перед использованием.

8.2.5. Положительный контроль (К+, флакон № 2), отрицательный контроль (К-, флакон № 3), буфер для разведения проб и конъюгата (БР, флакон № 5), стоп-раствор (флакон № 9) – готовы к применению.

9. Проведение анализа

9.1. В лунки А1-В1 вносят по 100 мкл положительного контроля, в лунки С1-Д1 - по 100 мкл отрицательного контроля.

В остальные лунки планшета вносят по 100 мкл испытуемых образцов (по две лунки на каждый образец), подготовленных по п.8.1. Разведение испытуемых проб можно проводить непосредственно в лунках планшета. Для этого в лунки вносят по 50 мкл буфера для разведения (БР, флакон №5), затем 50 мкл исходного материала и тщательно перемешивают.

Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 ч при температуре 37⁰С.

9.2. После окончания инкубации планшет 5 раз промывают рабочим раствором ФСБТ, приготовленном по п. 8.2.2., на автоматическом промывочном устройстве или вручную, доверху заполняя лунки (по 300 мкл/лунку). Затем жидкость окончательно удаляют, и планшет подсушивают, постукиванием по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

ВНИМАНИЕ. При этой процедуре возможно выпадение стрипов из рамки. Рекомендуется перед началом работы промаркировать стрипы для восстановления их первоначального расположения.

9.3. В каждую лунку вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, приготовленного по п. 8.2.3, планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 ч при температуре 37⁰С.

9.4. Планшет 5 раз промывают рабочим раствором ФСБТ (см. этап 9.2.).

9.5. В каждую лунку вносят по 100 мкл рабочего хромоген-субстратного раствора, приготовленного по п.8.2.4 и инкубируют 15 мин в темном месте при комнатной температуре.

9.6. Останавливают реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл стоп-раствора (1М H₂SO₄).

10. Учет и интерпретация результатов

10.1. После остановки реакции оптическую плотность субстратной смеси в лунках измеряют на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм (A₄₅₀).

10.2. Вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности для проб положительного контроля (A₄₅₀ K+) и проб отрицательного контроля (A₄₅₀ K-).

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

$$\begin{aligned} A_{450} K + &> 0,8 \\ A_{450} K - &< 0,3 \end{aligned}$$

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют. Если A₄₅₀ отрицательного и положительного контролей соответствуют вышеуказанным критериям, далее проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

10.3. Вычисляют отсекающие значения оптической плотности A₄₅₀ (Cut off), необходимые для правильной интерпретации результатов:

$$\begin{aligned} \text{Положительный Cut off} &= 6 \times A_{450} K - \\ \text{Отрицательный Cut off} &= 4 \times A_{450} K - \end{aligned}$$

10.4. Вычисляют среднее значение A₄₅₀ для каждой опытной пробы (A₄₅₀ ОП_{ср}).

10.5. Проводят интерпретацию результатов:

Пробу считают положительной, если A₄₅₀ ОП_{ср} выше, чем **положительный Cut off**.

Проба считается отрицательной, если A₄₅₀ ОП_{ср} ниже, чем **отрицательный Cut off**.

Если A₄₅₀ ОП_{ср} находится в интервале между значениями (4 x A₄₅₀ K-) и (6 x A₄₅₀ K-), к полученным результатам следует относиться как к сомнительным и, по возможности, повторить анализ.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

11. 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 АНО «НИИ ДПБ». Адрес: 109518, г. Москва, Грайвороновский 1-ый проезд, д. 2а. Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалей, д.16.

Рекомендовано к применению ФГБУ «ВГНКИ»