



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**Facultad de Veterinaria**  
Departamento de Sanidad Animal



# **СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОСТАНОВКИ ИФА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**

[jmvizcaino@vet.ucm.es](mailto:jmvizcaino@vet.ucm.es)  
Av/ Puerta de Hierro s/n.  
28040 Madrid.

Tel: (34) 913944082  
Fax: (34) 913943908



## 1. МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

- Одноканальные пипетки переменного объема 1-10  $\mu$ l
- Одноканальные пипетки переменного объема 10-100  $\mu$ l
- Одноканальные пипетки переменного объема 10-200  $\mu$ l
- Одноканальные пипетки переменного объема 200-1000  $\mu$ l
- Фильтровальная бумага
- Алюминиевая фольга
- Многоканальная пипетка 5-50 $\mu$ l
- Многоканальная пипетка 50-300 $\mu$ l
- NUNC-полистироловый планшет (ref: 469957.NUNC)
- Инкубатор на 37°C
- Аналитические весы
- Дистиллированная вода
- Планшет для инкубации (ref:170-3902.BIORAD)
- Ph-метр
- Шейкер или вортек
- Полистироловая пробирка объемом 50 мл (ref: 4870.COSTAR)
- Стерильные пластиковые пробирки (10 мл, 50 мл)
- Спектрофотометр UV/VIS со светофильтрами на 620 nm связанный с компьютерной программой для регистрации результатов.
- Настольная центрифуга.
- Резиновые перчатки.
  
- **Аг:** Антиген предоставляется референтной лабораторией по АЧС в лиофилизированном виде в пробирках объемом 0,5 мл, 1 мл или 2 мл. Разводится и хранится в аликвотах при -20°C. Срок хранения 18 месяцев.
- **ПК:** положительная контрольная сыворотка предоставляется референтной лабораторией по АЧС в лиофилизированном виде в пробирках объемом 0,5 мл, 1 мл или 2 мл. Разводится и хранится в аликвотах при -20°C. Срок хранения 18 месяцев.
- **ГК:** сыворотка граничных значений предоставляется референтной лабораторией по АЧС в лиофилизированном виде в пробирках объемом 0,5 мл, 1 мл или 2 мл. Разводится и хранится в аликвотах при -20°C. Срок хранения 18 месяцев.
- **ОК:** отрицательная контрольная сыворотка предоставляется референтной лабораторией по АЧС в лиофилизированном виде в пробирках объемом 0,5 мл, 1 мл или 2 мл. Разводится и хранится в аликвотах при -20°C. Срок хранения 18 месяцев.
- **КОНЬЮГАТ:** Протеин А пероксидаза 1мг/мл



• **КАРБОНАТ/БИКАРБОНАТНЫЙ БУФЕР 0,05M (pH 9,6):**

1,59 г -----  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  [Merck 1.06392]  
2,93 г -----  $\text{NaHCO}_3$  [Merck 10 6329]  
1 л. ----- Дистиллированная вода

Хранить при комнатной температуре. Проверить pH(9,6) перед использованием:

↑ pH: Натрия бикарбонат

↓ pH: натрия карбонат

• **ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

Использовать 30 %.

• **ОТМЫВОЧНЫЙ БУФЕР; ФСБ-ТВИН БУФЕР Ph 7,2:**

$\text{ClNa}$  [Merck 1.06404]----- 8 г  
 $\text{ClK}$  [Merck 1.04873]----- 0,2 г  
 $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  [Merck 1.06586]----- 0,2 г  
 $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  [Merck 1.04936]----- 1,15 г  
ТВИН-20 [Merck 8.22184]----- 0,5 мл  
 $\text{H}_2\text{O}$  дистиллированная ----- 1000 мл

Хранить при комнатной температуре. Проверить pH(9,6) перед использованием.

❖ **DMAВ -3- Dimethylaminobenzoic acid:**

Растворить 13,315 г DMAВ в 900 мл **ФСБ 0,1 М pH 7**

**-ФСБ 0,1 М pH 7:**

5,3 г -----  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$   
8,65 г -----  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$   
1 л -----  $\text{H}_2\text{O}$  дистиллированная

Перемешивайте раствор в течение 1 часа при комнатной температуре, доведите pH до 7 при помощи NaOH 5M. Доведите общий объем до 1 л. Профильтруйте и приготовьте аликвоты по 10 мл и 5 мл. Хранить при  $-20^\circ\text{C}$  в темноте.



❖ **MBTH -3- Methyl-2-benthiazolone hydrazone hydrochloride monohidrate:**

Растворите 0,3646 г MBTH в 900 мл в **ФСБ 0,1 М рН 7**.  
Перемешивайте раствор в течение 1 часа при комнатной температуре, доведите рН до 6,25 при помощи концентрированной HCl. Доведите общий объем до 1 л. Профильтруйте и приготовьте аликвоты по 10 мл и 5 мл. Хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$  в темноте.

• **Стоп- раствор (Серная кислота 3Н):**

Серная кислота----- 16,1 мл (в 200 мл дистиллированной воды).  
*Хранить при комнатной температуре.*

2. **Методология:**

❖ **Помните:** перед постановкой ИФА планшеты должны быть сенсibilизированы антигеном. В данном видео планшеты уже сенсibilизированы.

❖ ***Сенсibilизация микроплашет антигеном:***

○ Разведите аликвоту антигена карбонатно/бикарбонатном буфере рН 9,6. До рекомендованной концентрации.

Например: (Ag 1/1600): 6,25  $\mu\text{l}$  Ag + 9,99 мл карбонатно/бикарбонатного буфера рН 9,6.

- Добавьте 100  $\mu\text{l}$  в каждую лунку NUNC-полистиролового планшета.
- Инкубируйте  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 18 часов (или ночь)

Сенсibilизированные и высушенные планшеты могут храниться при  $4^{\circ}\text{C}$  один день, а при  $-20^{\circ}\text{C}$  несколько месяцев.

**2.1.** Промойте планшеты 4 раза отмывочным буфером. Переверните их на бумажную салфетку.

**2.2** Разведите исследуемую и контрольную сыворотки (1/30) на ФСБ/Твин-20 буфере.

- Добавьте 96,6  $\mu\text{l}$  ФСБ/Твин-20 буфера в несенсibilизированные лунки.
- Пометьте несенсibilизированные лунки, в которых вы будете готовить разведения сывороток.
- Добавьте 3,4  $\mu\text{l}$  исследуемой и контрольной сывороток.



**2.3** Добавьте 100  $\mu$ l разведенной сыворотки в каждую лунку планшета в двух повторах. Рекомендуется использовать лунки планшета в повторностях и для контрольных сывороток.

**2.4** Накройте планшет и инкубируйте 1 час при 37 °C помешивая.

**2.5** Промойте планшеты 4 раза отмывочным буфером. Переверните их на бумажную салфетку.

**2.6** Приготовление конъюгата (1/5000):

*Добавьте 2  $\mu$ l Протеина А к 9998  $\mu$ l ФСБ/Твин-20 буфера  
(Необходимый объем для одного планшета)*

**2.7** Добавьте 100  $\mu$ l конъюгата в каждую лунку. .

**2.8** Накройте планшет и инкубируйте 1 час при 37 °C помешивая.

**2.9** Промойте планшеты 4 раза отмывочным буфером. Переверните их на бумажную салфетку.

**2.10** Приготовление раствора субстрата:

*10 мл DMAВ + 10 мл MBTH + 5  $\mu$ l перекиси водорода H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)  
(Необходимый объем для одного планшета)*

**2.11** Добавьте 200  $\mu$ l субстрата в каждую лунку.

**2.12** Накройте плашку алюминиевой фольгой. Инкубируйте приблизительно 5-10 минут в темноте при комнатной температуре или до тех пор пока Отрицательный контроль не изменит цвет.

**2.13** Остановка реакции. Добавьте 50  $\mu$ l стоп раствора в каждую лунку.

**2.14** Учет результатов. Результаты могут быть учтены спектрофотометром UV/VIS с фильтром при длине волны 620 нм.



### 3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

#### ➤ ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТА:

Реакция выполнена правильно, если значения ОП для ПК (Положительного контроля) превышают значения ОП для ОК (Отрицательного контроля) не менее чем в 4 раза.

$$ОП\ ПК \geq 4\ ОП\ ОК$$

Значения ОП для ПК должно быть  $\geq 1.0$

Значения ОП для ОК должно быть  $\leq 0.250$

Значения ОП для ГК должно быть в диапазоне «серой зоны», со значениями ОП выше 0,7.

#### ➤ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ CUT OFF:

$$CUT\ OFF = (ОП\ Отрицательной\ сыворотки) + (ОП\ Положительной\ сыворотки \times 0,2)$$

- Отрицательная сыворотка ОП ниже величины CUT OFF -0,1.
- Положительная сыворотка: ОП выше величины CUT OFF + 0,100.
- Сомнительная сыворотка: ОП между величиной CUT OFF +/- 0,100.  
Данные результаты должны быть подтверждены постановкой Иммуноблоттинга.