

СОГЛАСОВАНО  
Директор ФГБУ «Всероссийский  
государственный Центр качества и  
стандартизации лекарственных средств  
для животных и кормов»  
(ФГБУ «ВГНКИ»), председатель ТК 454

  
\_\_\_\_\_ А.Н.Панин .

« 20 » июня 20 13 г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора  
по качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ»

  
\_\_\_\_\_ С.К. Старов

« 20 » июня 20 13 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антител  
к вирусу инфекционного энцефаломиелита птиц  
иммуноферментным методом при тестировании  
сывороток в одном разведении.

(Организация-производитель ФГБУ "ВНИИЗЖ",  
г. Владимир, мкр. Юрьеvec)

### I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к вирусу инфекционного энцефаломиелита птиц (ИЭП) иммуноферментным методом (ИФА) при тестировании сывороток в одном разведении.

2. В состав набора входят иммуноспецифические и неспецифические компоненты.

#### **Иммуноспецифические компоненты:**

- планшеты для ИФА с адсорбированным в лунках антигеном ИЭП - 2 планшета;

- гипериммунная сыворотка крови кур к ИЭП (положительный контроль), цельная лиофилизированная,  $0,5 \text{ см}^3$  – 1 флакон, или нативная,  $0,2 \text{ см}^3$  - 1 флакон;

- нормальная сыворотка крови кур (отрицательный контроль), не содержащая антител к ИЭП, цельная лиофилизированная,  $0,5 \text{ см}^3$  – 1 флакон, или нативная,  $0,2 \text{ см}^3$  - 1 флакон;

- антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против IgG кур, лиофилизированный,  $0,5 \text{ см}^3$  – 1 флакон, или концентрат раствора,  $0,3 \text{ см}^3$  - 1 флакон.

#### **Неспецифические компоненты:**

- концентрат буферного раствора для разведения контрольных и испытуемых проб, антивидового конъюгата,  $32,5 \text{ см}^3$  - 1 флакон;

- концентрат раствора для межэтапной промывки,  $130 \text{ см}^3$  - 1 флакон;

- раствор субстрата АБТС (2,2'-азино-ди[3-этил] бензтиазолинсульфоная кислота) с перекисью водорода,  $25 \text{ см}^3$  – 1 флакон;

Сыворотки - в высушенном виде - сухая пористая масса белого или светло-желтого цвета, в нативном виде - прозрачная жидкость желтого или красноватого цвета.

Антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против IgG кур - сухая пористая масса белого цвета или прозрачная бесцветная жидкость. Растворимость в воде высушенных компонентов - в пределах 2-3 мин.

Концентрат буферного раствора для разведения проб сывороток, антикуриного конъюгата - бесцветная прозрачная или с желтоватым оттенком жидкость.

Концентрат раствора для межэтапной промывки - бесцветная прозрачная жидкость

Раствор субстрата АБТС с перекисью водорода - зеленоватая прозрачная жидкость.

Концентрированный "стоп-раствор" - бесцветная прозрачная или с белым хлопьевидным осадком жидкость.

4. Компоненты набора расфасовывают в пластиковые с завинчивающимися крышками и стеклянные флаконы соответствующей вместимости.

На флаконы с компонентами наклеивают этикетки или наносят несмываемой краской маркировку с указанием: наименования организации-производителя и ее товарного знака, наименования компонента, объема/массы во флаконе, номера серии, срока годности, условий хранения, рабочего разведения компонента (для антивидового конъюгата).

На каждом планшете должна быть этикетка с указанием: организации-производителя и ее товарного знака; наименования антигена, адсорбированного в лунках планшета.

На упаковке с планшетами должна быть этикетка с указанием: наименования организации-производителя и ее товарного знака, наименования антигена, адсорбированного в лунках планшета, номера серии, срока годности, условий хранения.

Флаконы с компонентами набора и планшеты с адсорбированным антигеном упаковывают в картонные коробки.

На каждую коробку с набором наклеивают этикетку с указанием: наименования, адреса и товарного знака организации-производителя, наименования набора, перечня и количества компонентов, номера серии, даты изготовления (месяц, год), срока годности, условий хранения, обозначения ТУ, знака соответствия, штрих-кода и надписи "Для ветеринарного применения".

В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

Набор рассчитан на исследование 184 проб сывороток.

5. Срок годности набора 12 месяцев от даты изготовления при хранении и транспортировании в сухом темном при температуре от 2 °С до 8 °С. Применение набора после истечения срока годности запрещено.

6. При нарушении целостности и укупорки флаконов, упаковки планшетов, изменении цвета содержимого, наличии посторонних примесей во флаконах, при отсутствии этикеток на компонентах набора, а также в случае не использования в пределах срока годности неспецифические компоненты набора выбраковывают, а иммуноспецифические компоненты обеззараживают кипячением в течение 15 мин. Неиспользованные планшеты дезинфицируют в 3% растворе хлорамина.

Утилизация неспецифических компонентов набора не требует специальных мер безопасности.

## II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

7. Сущность непрямого варианта ИФА заключается в выявлении комплекса, образовавшегося между антигеном, сорбированным в лунках полистиролового планшета, и специфическими антителами, содержащимися в пробах сывороток крови кур. Специфический комплекс взаимодействует с антикуриными IgG, ковалентно связанными с ферментом пероксидазой, которая при взаимодействии с субстратом в составе хромогенной смеси (АБТС) вызывает ее окрашивание, интенсивность которого пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе.

## III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Набор предназначен для определения специфических антител к вирусу инфекционного энцефаломиелита птиц в сыворотках крови кур иммуноферментным методом при исследовании в одном разведении.

Для постановки реакции используют:

одно- и восьмиканальные автоматические пипетки переменного объема до 0,02 см<sup>3</sup>, до 0,2 см<sup>3</sup> и до 1,0 см<sup>3</sup> со сменными наконечниками, мерную лабораторную посуду, пробирки для разведения проб, дистиллированную или деионизированную воду, термостат с температурой нагрева (37,0±0,5)°С, бытовой холодильник, спектрофотометр (ридер) любой модели с фильтром на 405-410 нм для учетов результатов ИФА.

#### 9. Приготовление рабочих растворов

**Перед началом работы набор с компонентами выдерживают 30 мин при температуре от 18°С до 22°С.**

9.1. Буферный раствор для разведения контрольных сывороток, испытуемых сывороток, антикуриного конъюгата. Содержимое флакона с концентратом буферного раствора для разведения доводят дистиллированной водой до 250 см<sup>3</sup> и измеряют значение рН, которое должно быть в пределах 7,4-7,6. Хранят не более 20 суток при температуре 4°С.

9.2. Рабочий раствор конъюгата. Содержимое флакона с лиофилизированным конъюгатом растворяют в 0,5 см<sup>3</sup> буферного раствора для разведения проб. Раствор конъюгата хранится при температуре минус 10°С не более 7 суток. Возможно использование после однократной разморозки. Конъюгат в нативном виде готов к использованию. Рабочий раствор готовят перед использованием (таблица 1).

Таблица 1

Нормы расхода компонентов в расчете на один планшет

Компоненты набора	Рабочее разведение конъюгата					
	1:50	1:100	1:200	1:300	1:400	1:500
Раствор конъюгата, восстановленный, см <sup>3</sup>	0,200	0,100	0,050	0,033	0,025	0,020
Раствор конъюгата концентрированный, см <sup>3</sup>	-	0,100	0,050	0,033	0,025	0,020
Буферный раствор для разведения проб, см <sup>3</sup>	10	10	10	10	10	10

9.3. Содержимое флакона с лиофилизированной положительной контрольной сывороткой крови кур к ИЭП растворяют в 0,5 см<sup>3</sup> буферного раствора для разведения проб. Раствор рекомендуется хранить при температуре минус 10°С в течение 1 месяца. Сыворотки в нативном виде готовы к использованию.

9.4. Содержимое флакона с лиофилизированной нормальной сывороткой крови кур растворяют в 0,5 см<sup>3</sup> буферного раствора для разведения проб. Раствор рекомендуется хранить при температуре минус 10°С в течение 1 месяца. Сыворотки в нативном виде готовы к использованию.

9.5. Промывочный буферный раствор. Содержимое флакона с концентратом буферного раствора для отмывки доводят дистиллированной или деионизированной водой до  $1000 \text{ см}^3$  и тщательно перемешивают. Измеряют значение pH, которое должно быть в пределах 7,4-7,6. Данный раствор используют для межэтапной промывки планшетов. Раствор рекомендуют хранить при температуре от  $2^\circ\text{C}$  до  $8^\circ\text{C}$  в течение 1 мес.

9.6. "Стоп-раствор". Для приготовления рабочего раствора, останавливающего окраску (1:5)  $2,5 \text{ см}^3$  содержимого флакона с концентрированным "стоп-раствором" разводят в  $10 \text{ см}^3$  дистиллированной воды (в расчете на один планшет).

9.7. Разведение испытуемых и контрольных сывороток. Все испытуемые и контрольные пробы сывороток разводят 1:400 буферным раствором для разведения, используя для каждой пробы новый наконечник. С этой целью к  $1,0 \text{ см}^3$  буферного раствора для разведения добавляют  $0,0025 \text{ см}^3$  сыворотки крови кур и трижды пипетируют.

#### 10. Постановка реакции

10.1. Из комплекта набора берут планшет, сенсibilизированный антигеном ИЭП.

10.2. В лунки A1-A2 вносят по 100 мкл подготовленного отрицательного контроля.

10.3. В лунки A3-A4 вносят по 100 мкл подготовленного положительного контроля.

10.4. В остальные лунки планшета вносят по 100 мкл испытуемых проб сыворотки крови. Планшет накрывают крышкой и выдерживают 30 мин при температуре  $37^\circ\text{C}$ , после чего лунки освобождают от содержимого резким встряхиванием и трижды промывают промывочным буферным раствором (по 300 мкл на лунку). Затем жидкость окончательно удаляют и планшет подсушивают постукиванием по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

10.5. Во все используемые лунки планшета вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, накрывают крышкой и выдерживают 30 мин при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Трижды повторяют процедуру промывания.

10.6. Во все используемые лунки планшета вносят по 100 мкл раствора субстрата, накрывают крышкой и выдерживают 10 мин при температуре от  $20^\circ\text{C}$  до  $25^\circ\text{C}$ .

10.7. Реакцию останавливают добавлением в каждую используемую лунку по 100 мкл подготовленного "стоп-раствора".

11. Учет результатов анализа проводят инструментальным способом сразу же после остановки реакции, используя спектрофотометр (ридер) с вертикальным лучом света при длине волны 405-410 нм.

Реакцию оценивают по отношению значений оптической плотности (ОП) испытуемой пробы (S) к значению оптической плотности положительного контроля (P), что отражает относительное количество антител в исследуемых образцах.

Среднее значение ОП отрицательных контролей должно быть не выше 0.150

Разница показателей между средним значением ОП положительного контроля и средним значением отрицательного контроля допустима в диапазоне 0,400-0,950. Если полученные значения выходят за пределы этих значений, результаты считаются недостоверными и реакцию повторяют.

Расчет S/P - отношения:

$$S/P = \frac{\text{значение ОП испыт. сыворотки} - \text{средн. значение ОП отрицательного контроля}}{\text{сред. значение ОП полож. контроля} - \text{сред. значение ОП отрицательного контроля}}$$

Полученные значения S/P позволяют дифференцировать испытуемые сыворотки на положительные, отрицательные и сомнительные. Пробы сывороток со значениями S/P ниже или равными 0,087 считаются отрицательными, если больше 0,134 - положительными.

Расчет титра антител.

Титр антител в исследуемых пробах сыворотки крови, разведенных 1:400, вычисляют по следующей формуле:

$$Tump = \text{antilg} (1,1877 (\lg S/P) + 3,73233)$$

Пробы сывороток со значениями титра антител в пределах от 0 до 405 считаются отрицательными, больше 811 – положительными, промежуточные значения считаются сомнительными.

По результатам ИФА определяют напряженность иммунитета в партии привитых цыплят путем деления количества положительных проб к общему количеству исследованных сывороток и выражают в процентах.

Птицу считают иммунной к ИЭП при напряженности иммунитета 80 и более процентов (т.е. если в 80 и более процентах исследованных проб сывороток крови получены положительные результаты).

Обнаружение антител в титрах более 1:500 у невакцинированной птицы свидетельствует о возможной циркуляции в стаде полевого вируса. В таких случаях

через 21-30 дней проводят повторное исследование проб сывороток крови, полученных от этих же птиц.

Снижение или стабилизация уровня антител и (или) уменьшение количества птиц с высоким уровнем антител при повторных исследованиях проб сывороток крови свидетельствует об отсутствии циркуляции в хозяйстве эпизоотического вируса и является следствием поствакцинальных реакций.

Нарастание титров и (или) увеличение количества птиц с высоким уровнем антител при отсутствии клинических и патологоанатомических признаков инфекционного энцефаломиелита птиц не является основанием для объявления в хозяйстве неблагополучия по данному заболеванию, но предусматривает установление за птицей тщательного наблюдения, проведения систематических серологических и вирусологических исследований.

#### IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

12. При работе с набором следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными средствами ветеринарного назначения.

13. Все лица, участвующие в проведении испытаний, должны быть одеты в спецодежду (халат, брюки, головной убор, резиновые перчатки) и обеспечены индивидуальными средствами защиты. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

14. При работе с набором следует избегать нарушения целостности стеклянных флаконов, в которые расфасованы компоненты набора.

При нарушении целостности флаконов и порезах рук стеклом, первую помощь оказывают согласно общепринятым методикам.

15. Работу с химическими компонентами набора следует проводить очень осторожно. При попадании их на кожу и/или слизистые оболочки рекомендуется промыть пораженное место большим количеством водопроводной воды.

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

17. Набор следует хранить в местах, не доступных для детей.

Организация-производитель: федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ"), 600901, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьеvec.

Инструкция по применению "Набора для выявления антител к вирусу инфекционного энцефаломиелита птиц иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении" разработана ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевец.

С утверждением настоящей инструкции утрачивает силу "Инструкция по применению набора для определения антител к вирусу инфекционного энцефаломиелита птиц иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении", утвержденная заместителем руководителя Россельхознадзора от 30 мая 2006 г.