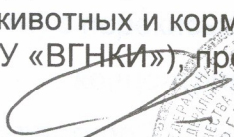


СОГЛАСОВАНО

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


А.Н.Панин
«20» июня 2013 г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора
по качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ»


С.К. Старов
«03» июля 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора для определения антител к
Mycoplasma gallisepticum иммуноферментным методом
при тестировании сывороток в одном разведении

(Организация-производитель: ФГБУ «ВНИИЗЖ»,
г. Владимир, мкр. Юрьевец)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для определения антител к *Mycoplasma gallisepticum* иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении.

2. В состав набора входят иммуноспецифические и неспецифические компоненты.

Иммуноспецифические компоненты

- полистироловые 96-луночные планшеты с адсорбированным в лунках очищенным инактивированным антигеном *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) – 2 шт.;
- положительная сыворотка крови кур к Mg (положительный контроль), лиофилизированная, объем 0,5 см³, или нативная, объем 0,2 см³ – 1 флакон;
- нормальная сыворотка крови кур (отрицательный контроль), не содержащая антител к Mg, лиофилизированная, объем 0,5 см³, или нативная, объем 0,2 см³ - 1 флакон;
- антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против IgG кур, лиофилизованный, объем 0,5 см³, или в виде концентрированного раствора, объем 0,3 см³ – 1 флакон.

Неспецифические компоненты

- буферный раствор (концентрированный) для разведения контрольных и испытуемых сывороток и антивидового конъюгата, объем 32,5 см³ – 1 флакон;
- буферный раствор (концентрированный) для межэтапных промывок, объем 130,0 см³ - 1 флакон;

- субстрат - раствор АБТС (2,2'-азино-ди[3-этил]бензтиазолинсульфоная кислота) с перекисью водорода, объем 25,0 см³ – 1 флакон;

- «стоп-раствор» - 5% раствор додецилсульфата натрия (5-кратный концентрированный раствор), объем 5,0 см³ - 1 флакон.

3. Иммуноспецифические компоненты расфасованы в стеклянные флаконы, закупоренные пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками, или полимерные флаконы с завинчивающимися крышками. По внешнему виду представляют собой:

- сыворотки - в лиофилизированном виде - сухую пористую массу светло-желтого или красноватого цвета, в нативном виде - прозрачную жидкость желтого или красноватого цвета;

- антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против IgG кур – в лиофилизированном виде - сухую пористую массу белого цвета, в виде концентрированного раствора - прозрачную бесцветную или с желтоватым оттенком жидкость.

При добавлении буферного раствора содержимое флаконов с лиофилизированными компонентами должно полностью раствориться в течение 2-3 мин.

Неспецифические компоненты расфасованы в полимерные флаконы с завинчивающимися крышками. По внешнему виду представляют собой:

- буферный раствор (концентрированный) для разведения контрольных и испытуемых сывороток, антивидового конъюгата - прозрачная бесцветная жидкость;

- буферный раствор (концентрированный) для межэтапных промывок - прозрачная бесцветная жидкость;

- субстрат - прозрачная зеленоватая жидкость;

- «стоп-раствор» (концентрированный) - прозрачная бесцветная жидкость, допускается выпадение белого хлопьевидного осадка, исчезающего после прогревания при температуре 37°C в течение 15 мин.

4. 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; названия 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, в которой указывают: наименование, адрес и товарный знак организации-производителя, наименование набора, перечень и количество компонентов, номер серии, дату изготовления (месяц, год), срок годности, условия хранения, обозначение стандарта, знак соответствия, штрих-код и надпись "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 месте при температуре от 2°C до 8°C. Применение набора после истечения срока годности запрещено.

6. При нарушении целостности и укупорки флаконов, упаковки планшетов, изменении цвета и консистенции содержимого, наличии посторонней примеси 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. ПРИНЦИП РЕАКЦИИ

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 антивидовыми IgG, ковалентно связанными с ферментом пероксидазой хрена, которая при взаимодействии с субстратом в составе хромогенной смеси (АБТС) вызывает ее окрашивание. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Набор предназначен для:

- контроля за распространением *Mycoplasma gallisepticum* в популяциях кур;
- оценки эффективности иммунизации птицепоголовья против респираторного микоплазмоза;
- ретроспективной диагностики респираторного микоплазмоза у кур по приросту выявления специфических антител в сыворотках крови.

Для постановки метода ИФА используют:

- пипетки одно- и восьмиканальные автоматические фиксированного и переменного объема от 0,001 до 1,000 см³ со сменными наконечниками,
- термостат с поддержанием температуры (37,0±0,5)°С,
- воду дистиллированную (рН=6,0-6,2),
- холодильник бытовой,
- посуду мерную лабораторную,
- рН-метр,
- спектрофотометр (ридер) с вертикальным лучом, фильтром для измерений при длине волны 405 нм любой модели для учета результатов ИФА.

Перед началом работы набор с компонентами выдерживают 30 мин при температуре от 18 до 25°С.

9. Подготовка рабочих растворов

9.1. *Буферный раствор для разведения контрольных и испытуемых сывороток, антивидового конъюгата (раствор №1).* Содержимое флакона с концентратом буферного раствора для разведения перелить в мерную посуду, добавить дистиллированной воды до 250 см³ и тщательно перемешать, измерить значение рН, которое должно быть в пределах 7,4-7,6. Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2°С до 8°С не более одного месяца.

9.2. *Буферный раствор для межэтапных промывок (раствор №2).* Содержимое флакона с концентрированным буферным раствором для межэтапных промывок перелить в мерную посуду, добавить дистиллированной воды до 1000 см³ и тщательно перемешать. Измерить величину рН, которая должна быть в пределах 7,4-7,6. Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2°С до 8°С не более одного месяца.

9.3. "Стоп-раствор". К содержимому флакона с концентрированным "стоп-раствором" добавить 20,0 см³ дистиллированной воды и перемешать. Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2°C до 8°C не более одного месяца.

10. Подготовка иммуноспецифических компонентов набора и испытуемых сывороток.

10.1. К содержимому флакона с лиофилизированной положительной контрольной сывороткой крови кур добавить 0,5 см³ раствора №1. Подготовленную сыворотку рекомендуется хранить при температуре минус 10°C и ниже не более одного месяца. В течение срока годности размораживание допускается два раза. Сыворотка в нативном виде готова к использованию.

10.2. К содержимому флакона с лиофилизированной нормальной сывороткой крови кур добавить 0,5 см³ раствора №1. Подготовленную сыворотку рекомендуется хранить при температуре минус 10°C и ниже не более одного месяца. В течение срока годности размораживание допускается два раза. Сыворотка в нативном виде готова к использованию.

10.3. Рабочий раствор конъюгата. К содержимому флакона с лиофилизированным конъюгатом добавить в 0,5 см³ раствора №1. Раствор конъюгата рекомендуется хранить при температуре минус 10°C и ниже не более одного месяца. Возможно использование после однократной разморозки. Конъюгат в концентрированном виде готов к использованию.

Для приготовления рабочего разведения конъюгата, указанного на этикетке флакона, к восстановленному или концентрированному компоненту добавить раствор №1 в объеме, указанном в таблице 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 ³	0,200	0,100	0,050	0,033	0,025	0,020
Раствор конъюгата концентрированный, см ³	-	0,100	0,050	0,033	0,025	0,020
Раствор №1, см ³	10	10	10	10	10	10

Рабочий раствор конъюгата готовят непосредственно перед внесением в лунки планшета.

10.4. Разведение испытуемых и контрольных сывороток. Все испытуемые и контрольные пробы сывороток крови развести 1:400 раствором №1. С этой целью к 1,0 см³ раствора №1 добавить 0,0025 см³ сыворотки крови кур и трижды пипетировать, используя для каждой пробы новый наконечник.

11. Постановка реакции

11.1. Для исследования из птицевхозыств доставляют не менее 20 проб (по 0,2-0,3 см³) сыворотки крови кур. До постановки ИФА сыворотки рекомендуется хранить в морозильной камере бытового холодильника (минус 20°С) в течение 50-60 сут, при температуре 4°С – не более 4-х суток.

11.2. Из комплекта набора взять планшет, сенсibiliзирoванный антигеном Mg.

11.3. В лунки А1-А2 внести нормальную сыворотку (отрицательный контроль), подготовленную по п.10.4., в объеме 0,1 см³.

11.4. В лунки А3-А4 внести положительную сыворотку (положительный контроль), подготовленную по п.10.4., в объеме 0,1 см³.

11.5. В остальные лунки планшета внести испытуемые пробы сыворотки крови, подготовленные по п.10.4., в объеме 0,1 см³. Планшет накрыть крышкой и инкубировать 30 мин при температуре 37°С. По окончании инкубации лунки планшета освободить от содержимого резким встряхиванием и трехкратно промыть раствором №2 (по 0,3 см³ в каждую лунку). Затем жидкость окончательно удалить, и планшет подсушить постукиванием по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

11.6. Во все используемые лунки планшета внести по 0,1 см³ рабочего разведения конъюгата, накрыть крышкой и инкубировать 30 мин при температуре 37°С. По окончании инкубации лунки планшета освободить от содержимого резким встряхиванием и трехкратно промыть раствором №2 (по 0,3 см³ в каждую лунку). Затем жидкость окончательно удалить и планшет подсушить постукиванием по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

11.7. Во все используемые лунки планшета внести по 0,1 см³ раствора субстрата, накрыть крышкой и выдержать 10 мин при температуре от 20°С до 25°С.

11.8. Реакцию остановить добавлением в каждую используемую лунку по 0,1 см³ подготовленного “стоп-раствора”.

12. Учет результатов ИФА проводят инструментальным способом сразу же после остановки реакции, используя спектрофотометр (ридер) с вертикальным лучом света при длине волны 405 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.

При правильной постановке ИФА и использовании качественных компонентов набора среднее значение ОП отрицательных контролей должно быть не выше 0,200.

Разница показателей между средним значением ОП положительного контроля и средним значением отрицательного контроля допустима в диапазоне 0,4 – 1,0. 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 крови со значениями S/P ниже или равными 0,152 считаются отрицательными, 0,153 - 0,253 – сомнительными, больше или равными 0,254 – положительными.

Расчет титра антител.

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

$$Tump = \text{antilg} (1,3591 \lg (S/P) + 3,7303)$$

Пробы сывороток крови, содержащие антитела в титре 1:415 и ниже считаются отрицательными, 1:416-1:832 – сомнительными, 1:833 и выше – положительными.

13. Интерпретация результатов

По результатам ИФА определяют напряженность иммунитета в партии привитых цыплят путем деления количества проб с титром антител 1:1500 и выше (после применения инактивированных вакцин) к общему количеству исследованных сывороток и выражают в процентах.

Птицу считают иммунной к Mg при напряженности иммунитета 90 и более процентов (т.е. если в 90 и более процентах исследованных проб сывороток крови получены положительные результаты).

Обнаружение антител в титрах более 1:833 у невакцинированной птицы свидетельствует о возможной циркуляции в стаде *Mycoplasma gallisepticum*. В таких случаях через 21-30 сут 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 *Mycoplasma gallisepticum* и является следствием поствакцинальных реакций.

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

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

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

15. 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.

16. 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.

17. 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.

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

19. 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 Юрьевец.

Инструкция по применению " Набора для определения антител к *Mycoplasma gallisepticum* 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 *Mycoplasma gallisepticum* иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении", утвержденная заместителем руководителя Россельхознадзора от 31 марта 2009 г.