

СОГЛАСОВАНО

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

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора
по качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.К. Старов

«20» июня 2013 г.

А.Н.Панин

«08» июля 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для определения антител
к вирусу инфекционной бурсальной болезни
иммуноферментным методом при тестировании
сывороток в одном разведении»

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

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Набор для определения антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни 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 вируса инфекционной бурсальной болезни (ИББ) - 2 шт.;

- положительная сыворотка крови кур к вирусу ИББ (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 вирусу ИББ, лиофилизированная, объем 0,5 см³, или нативная, объем 0,2 см³ - 1 флакон;

- антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против IgG кур, лиофилизированный, объем 0,5 см³, или концентрат раствора, объем 0,3 см³ - 1 флакон.

Неспецифические компоненты:

- буферный раствор (концентрированный) для разведения контрольных и испытуемых сывороток и антивидового иммунопероксидазного конъюгата, объем 32,5 см³ - 1 флакон;
- буферный раствор (концентрированный) для межэтапной промывки планшетов, объем 130,0 см³ - 1 флакон;
- субстрат АБТС (2,2'-азино-ди[3-этил]бензтиазолинсульфоновая кислота) содержащий перекись водорода, объем 25,0 см³ - 1 флакон;
- "стоп-раствор" - 5% раствор додецилсульфата натрия (5-кратный концентрат), объем 5,0 см³ - 1 флакон.

3. Иммуноспецифические компоненты расфасованы в стеклянные флаконы, закупоренные пробками с 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 и антивидового конъюгата - бесцветную прозрачную жидкость;
- буферный раствор (концентрированный) для межэтапной промывки планшетов - бесцветную прозрачную жидкость;
- субстрат - зеленоватую прозрачную жидкость;
- "стоп-раствор" - бесцветную прозрачную жидкость. Допускается выпадение белого хлопьевидного осадка, исчезающего после прогревания при температуре 37 °С в течение 15 мин.

Планшеты запаяны в пакет из целлофана или фольгированной бумаги, в которую вложен влагопоглотитель.

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 её товарного знака, наименование антигена, сорбированного 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 СТО, 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 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. ПРИНЦИП РЕАКЦИИ

7. Сущность непрямого варианта ИФА заключается в выявлении комплекса, образованного антигеном, сорбированным в лунках полистиролового планшета и специфическими антителами, содержащимися в пробах сывороток крови кур. Специфический комплекс выявляется антивидовыми IgG, ковалентно связанными с

ферментом - пероксидазой хрена, который при взаимодействии с субстратом в составе хромогенной смеси (АБТС) вызывают ее окрашивание. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Набор предназначен для:

- контроля за распространением ИББ в популяциях кур;
- оценки эффективности иммунизации птицепоголовья против данного заболевания;
- ретроспективной диагностики ИББ у кур по приросту уровня специфических антител.

Для постановки реакции используют:

- пипетки одно- и восьмиканальные автоматические переменного объема до $0,02 \text{ см}^3$, до $0,2 \text{ см}^3$ и до $1,0 \text{ см}^3$ со сменными наконечниками;
- посуду мерную лабораторную;
- пробирки для разведения проб;
- воду дистиллированную;
- термостат с поддержанием температуры $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой;
- рН-метр;
- спектрофотометр (ридер) с вертикальным лучом света при длине волны 405 нм
- для учета результатов ИФА.

9. Подготовка рабочих растворов

Перед началом работы набор с компонентами выдерживают 30 мин при температуре от 20°C до 25°C .

9.1. Буферный раствор для разведения контрольных и испытуемых сывороток, антивидового конъюгата (раствор №1) - содержимое флакона с концентрированным буферным раствором перелить в мерную посуду, добавить дистиллированной воды до 250 см^3 и перемешать. Измерить величину рН, которая должна быть в пределах 7,4-7,6. Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2°C до 8°C не более одного месяца.

9.2. Буферный раствор для межэтапных промывок (раствор №2) - содержимое флакона с концентрированным буферным раствором для межэтапной промывки планшетов перелить в мерную посуду, добавить дистиллированной воды до 1000 см^3 и тщательно перемешать. Измерить величину рН, которая должна быть в пределах 7,4-

7,6. Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2°C до 8°C не более одного месяца.

9.3. "Стоп-раствор" - к содержимому флакона с концентрированным "стоп-раствором" добавить 20 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 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 применению.

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 применению.

10.3. Все испытуемые и контрольные пробы сыворотки крови развести 1:400 раствором №1. Для чего к 1,0 см³ раствора №1 добавить 0,0025 см³ сыворотки крови кур и трижды пипетировать, используя для каждой пробы новый наконечник.

10.4. Рабочий раствор конъюгата - к содержимому флакона с лиофилизированным конъюгатом добавить 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

Буферный раствор для разведения проб, см ³	10	10	10	10	10	10
---	----	----	----	----	----	----

Рабочий раствор конъюгата готовят непосредственно перед внесением в лунки планшета.

11. Постановка реакции

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

11.2. Из комплекта набора взять планшет, сенсibilизированный антигеном вируса ИББ.

11.3. В лунки А1-А2 внести нормальную сыворотку (отрицательный контроль), подготовленную по п. 10.3, в объеме 0,1 см³.

11.4. В лунки А3-А4 внести положительную сыворотку, подготовленную по п. 10.3, в объеме 0,1 см³.

11.5. В остальные лунки планшета внести испытуемые пробы, подготовленные по п. 10.3, в объеме 0,1 см³. Планшет накрыть крышкой и инкубировать 30 мин при температуре 37°C. 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°C. По окончании инкубации лунки планшета освободить от содержимого 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 10-15 мин при температуре 20- 25°C.

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

12. Учет результатов ИФА провести после остановки реакции, используя спектрофотометр (ридер) с вертикальным лучом света при длине волны 405 нм.

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 0,4-0,9. Если полученные данные 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 0,1396 считаются отрицательными, 0,1397-0,1802 - сомнительными, больше 0,1803 - положительными.

Расчет титра антител.

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

$$Tump = \text{antilg} (1,714 (\lg S/P) + 3,855)$$

Пробы сывороток, содержащими антитела в титре 1:245 и ниже считаются отрицательными, 1:246-1:379 - сомнительными, 1:380 и выше – положительными.

13. Интерпретация результатов

По результатам ИФА определяют напряженность иммунитета в партии привитых кур путем деления количества положительных проб на общее количество исследованных сывороток и выражают в процентах.

Птицу считают иммунной к вирусу инфекционной бурсальной болезни при напряженности иммунитета 90 и более процентов (т.е. если в 90 и более процентах исследованных проб сывороток крови титр антител 1:380 и выше).

Обнаружение антител у невакцинированной птицы свидетельствует о возможной циркуляции в стаде полевого вируса ИББ. В таких случаях через 21-30 суток проводят повторное исследование проб сывороток крови, полученных от этих же птиц.

Наращение титров и (или) увеличение количества птиц с высоким уровнем антител при отсутствии клинических и патологоанатомических признаков ИББ 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

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 вирусу инфекционной бурсальной болезни 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 инфекционной бурсальной болезни иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении", утвержденная заместителем руководителя Россельхознадзора от 27 июня 2007 г.