

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Руководителя

Россельхознадзора

Н.А. Власов



2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для определения антител
к пневмовирусу птиц
иммуноферментным методом при тестировании
сывороток в одном разведении
(Организация-производитель: ФГУ «ВНИИЗЖ»,
г. Владимир, мкр. Юрьевец)

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Набор для определения антител к пневмовирусу птиц иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении.

2. В состав набора входят иммуноспецифические и неспецифические компоненты.

Иммуноспецифические компоненты:

- полистироловые 96-луночные микропланшеты с адсорбированным в лунках очищенным инактивированным антигеном пневмовируса птиц (ПВП) – 2 шт.;
- положительная сыворотка крови кур к ПВП (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 ПВП, лиофилизированная, объем 0,5 см³, или нативная, объем 0,2 см³ – 1 флакон;
- антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против IgG кур, в виде концентрированного раствора, объем 0,1 см³ – 1 флакон.

Неспецифические компоненты:

- буферный раствор для разведения контрольных и испытуемых сывороток и антивидового иммунопероксидазного конъюгата, объем 130,0 см³ - 1 флакон;
- буферный раствор (концентрированный) для межэтапной промывки микропланшетов, объем 130,0 см³ - 1 флакон;
- субстрат – раствор 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 - прозрачную бесцветную 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 для разведения контрольных и испытуемых сывороток и антивидового конъюгата – желтоватую прозрачную жидкость;
- буферный раствор (концентрированный) для межэтапной промывки микропланшетов - бесцветную прозрачную жидкость;
- субстрат - зеленоватую прозрачную жидкость;
- "стоп-раствор" - бесцветную прозрачную жидкость. Допускается выпадение белого хлопьевидного осадка, исчезающего после прогревания при температуре 37°C в течение 15 мин.

Микропланшеты запаиваются в пакет из целлофана или фольгированной бумаги, в который вложен влагопоглотитель.

4. На флаконы с компонентами набора наклеивают этикетки или наносят несмываемой краской маркировку с указанием: наименования организации-производителя и ее товарного знака, наименования компонента, объема во флаконе (см³), номера серии, номера контроля, рабочего разведения компонента (для антивидового конъюгата).

На упаковке с микропланшетами должна быть этикетка с указанием: наименования организации-производителя и ее товарного знака, наименования антигена, адсорбированного в лунках планшета, номера серии и контроля. Флаконы с компонентами набора и микропланшеты упаковывают в картонные коробки.

На коробку наклеивают этикетку, в которой указывают: наименование ведомства, наименование, адрес и товарный знак организации-производителя, название набора, перечень и количество компонентов, номер серии и контроля, дату изготовления (месяц, год), срок годности, условия хранения, обозначение ТУ, знак соответствия, регистрационный номер, штрих-код и надпись «Для животных».

В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

Набор рассчитан на исследование 184 проб сыворотки крови кур.

Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения исследований по мере поступления биологического материала при соблюдении условий подготовки и хранения (по пп. 9.1.-9.6.).

5. Срок годности набора 12 мес с даты изготовления при хранении и транспортировании в сухом защищенном от света месте и температуре от 2°C до 8°C.

Набор не должен применяться после истечения срока годности.

6. При нарушении целостности и укупорки флаконов, упаковки микропланшетов, изменении цвета содержимого, наличии плесени и посторонних примесей во флаконах, при отсутствии этикеток на компонентах набора, а также в случае неиспользования в пределах срока годности неспецифические компоненты набора выбраковывают, а иммуноспецифические компоненты обеззараживают кипячением в течение 15 мин. Неиспользованные микропланшеты 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 Ig G, ковалентно связанными с ферментом - пероксидазой хрена, который при взаимодействии с субстратом (H₂O₂) в составе хромогенной смеси (АБТС) вызывает её окрашивание. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Набор предназначен для:

- серологического контроля за распространением пневмовирусной инфекции птиц в популяциях кур;
- оценки эффективности иммунизации поголовья против данного заболевания;
- ретроспективной диагностики пневмовирусной инфекции у кур по приросту уровня специфических

антител.

Для постановки реакции используют:

- термостат с поддержанием температуры (37,0±0,5)°C;

- холодильник бытовой;

- рН-метр

- спектрофотометр (ридер) с вертикальным лучом света при длине волны 405 нм - для учета результатов ИФА.

Перед началом работы набор с компонентами выдерживают 30 мин при температуре от 18°C до 20°C.

9. Подготовка рабочих растворов

9.1. Буферный раствор для разведения контрольных и испытуемых сывороток и антивидового иммунопероксидазного конъюгата (раствор №1) – готов к применению. Вскрытый флакон с раствором 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 микропланшетов перелить в мерную посуду, добавить дистиллированной воды до 1000,0 см³ и тщательно перемешать. Измерить величину pH, 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 20,0 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 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 1:200 раствором №1. Для чего к 0,5 см³ раствора №1 добавить 0,0025 см³ сыворотки крови кур и трижды пипетировать, используя для каждой пробы новый наконечник.

10.4. Рабочий раствор конъюгата. Конъюгат в концентрированном виде готов к использованию.

Для приготовления рабочего разведения конъюгата, указанного на этикетке флакона, к 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					
	1:200	1:300	1:400	1:500	1:600	1:700
Раствор конъюгата, концентрированный, см ³	0,050	0,033	0,025	0,020	0,017	0,014
Раствор №1, см ³	10	10	10	10	10	10

Рабочий раствор конъюгата готовят непосредственно перед внесением в лунки микропланшета.

11. Постановка реакции

11.1. Для исследования из птицеводств 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°С) в течение 50-60 сут, при температуре 4°С – не более 4-х сут.

11.2. Из комплекта набора взять микропланшет, сенсibilизированный антигеном пневмовируса птиц.

11.3. Во все лунки планшета внести раствор №1, в объеме 0,05 см³.

11.4. В лунки А1-А2 внести нормальную сыворотку (отрицательный контроль), подготовленную по п.10.3., в объеме 0,05 см³

11.5. В лунки А3-А4 внести положительную сыворотку, подготовленную по п. 10.3., в объеме 0,05 см³.

11.6. В остальные лунки микропланшета внести испытуемые пробы, подготовленные по п.10.3., в объеме 0,05 см³. Микропланшет накрыть крышкой и инкубировать 30 мин при температуре 37°С. По окончании инкубации лунки микропланшета освободить от содержимого резким встряхиванием и трёхкратно промыть раствором №2 (по 0,3 см³ в каждую лунку). Затем жидкость окончательно удалить и микропланшет подсушить постукиванием по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

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

11.7. Во все используемые лунки микропланшета внести по 0,1 см³ раствора субстрата, накрыть крышкой и выдержать 10-15 мин при температуре 20-25°С.

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 0,5-1,0. Если полученные данные выходят за пределы этих значений, результаты считаются недостоверными и реакцию повторяют.

Расчет S/P - отношения:

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

Полученные значения S/P позволяют дифференцировать испытуемые сыворотки на положительные, отрицательные и сомнительные. Пробы сывороток крови со значениями S/P ниже или равными 0,1428 считаются отрицательными; 0,1429-0,2143 – сомнительными, больше или равными 0,2144 – положительными.

Расчет титра антител

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

$$Tump = \text{antilg} (1,706 (\lg S/P) + 3,919)$$

Пробы сывороток крови, содержащие антитела в титре 1:300 и ниже считаются отрицательными, в интервале 1:301-1:599 – сомнительными, 1:600 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 пневмовирусу птиц при напряженности иммунитета 90 и более процентов (т.е. если в 90 и более процентах исследованных проб сывороток крови титр антител 1:800 и выше).

Обнаружение антител у невакцинированной птицы свидетельствует о возможной циркуляции в стаде полевого вируса. В таких случаях через 21-30 сут. 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 пневмовирусной инфекции 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 избегать нарушения целостности стеклянных флаконов, в которые расфасованы компоненты набора.

- пипетки одно- и восьмиканальные автоматические переменного объема до 0,02 см³, до 0,2 см³ и до 1,0 см³ со сменными наконечниками;
- посуду мерную лабораторную;
- пробирки для разведения проб;
- воду дистиллированную;
- термостат с поддержанием температуры (37,0±0,5)°С;

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 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.

Инструкция по применению разработана организацией-производителем ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»), 600901, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевоц.

С утверждением настоящей инструкции по применению утрачивает силу инструкция по применению набора для определения антител к пневмовирусу птиц иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении, утвержденная заместителем Руководителя Россельхознадзора 3 апреля 2006года.