

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 выявления антител
к *Mycoplasma synoviae* иммуноферментным методом
при тестировании сывороток в одном разведении

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

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к *Mycoplasma synoviae* (MS) 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 очищенным инактивированным антигеном *Mycoplasma synoviae* - 2 планшета;
- гипериммунная сыворотка крови кур к MS (положительный контроль), цельная лиофилизованная, 0,5 см³ – 1 флакон, или нативная, 0,2 см³ - 1 флакон;
- нормальная сыворотка крови кур (отрицательный контроль), не содержащая антител к MS, цельная лиофилизованная, 0,5 см³ – 1 флакон, или нативная, объем 0,2 см³ - 1 флакон;
- антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против IgG кур, лиофилизованный, 0,5 см³ – 1 флакон, или концентрат раствора, объем 0,3 см³ - 1 флакон.

Неспецифические компоненты:

- концентрат буферного раствора для разведения контрольных и испытуемых проб, антивидового конъюгата, объем 32,5 см³ - 1 флакон;
- концентрат раствора для межэтапной промывки, объем 130 см³ - 1 флакон;

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

- концентрированный 5-кратный раствор, останавливающий окраску ("стоп-раствор") - 5% раствор додецилсульфата натрия, объем 5 см³ - 1 флакон.

3. Внешний вид

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 или с желтоватым оттенком жидкость. Растворимость в воде высушенных компонентов - в пределах 2-3 мин.

Концентрат буферного раствора для разведения проб сывороток, антикуринового конъюгата - бесцветная прозрачная жидкость.

Концентрат раствора для межэтапной промывки - бесцветная прозрачная жидкость

Раствор субстрата АБТС с перекисью водорода - зеленоватая прозрачная жидкость.

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

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; 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 (мес, 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. 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 окрашивания прямо пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Набор предназначен для определения специфических антител к *Mycoplasma synoviae* в сыворотках крови кур иммуноферментным методом при исследовании в одном разведении.

Для постановки реакции используют:

- пипетки одно- и восьмиканальные автоматические переменного объема до 0,02 см³, до 0,2 см³ и до 1,0 см³ со сменными наконечниками;
- посуда мерная лабораторная;
- пробирки для разведения проб;
- вода дистиллированная или деионизированная;
- термостат с температурой нагрева (37,0±0,5)°С;
- холодильник бытовой;
- 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 20°С до 25°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 см³ и измеряют значение рН, которое должно быть в пределах 7,4-7,6. Хранят не более 20 сут при температуре (4±2 °С).

9.2. Рабочий раствор конъюгата. Содержимое флакона с лиофилизированным конъюгатом растворяют в 0,5 см³ буферного раствора для разведения проб (раствора №1). Раствор конъюгата рекомендуется хранить при температуре минус 10°С не более 7 сут. Возможно использование после однократной разморозки. Конъюгат в нативном виде готов к использованию. Для приготовления рабочего раствора лиофилизированный конъюгат или концентрат конъюгата разводят буферным раствором до разведения, указанного на этикетке флакона, рабочий раствор готовят перед использованием (таблице1).

Таблица 1

Нормы расхода компонентов в расчете на один планшет

Необходимые компоненты	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

9.3. Содержимое флакона с лиофилизированной положительной контрольной сывороткой крови кур к MS растворяют в $0,5 \text{ см}^3$ буферного раствора для разведения проб. Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2°C до 8°C не более 5 сут. Сыворотка в нативном виде готова к использованию.

9.4. Содержимое флакона с лиофилизированной нормальной сывороткой крови кур растворяют в $0,5 \text{ см}^3$ буферного раствора для разведения проб. Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2°C до 8°C не более 5 сут. 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 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 рекомендуется хранить при температуре от 2°C до 8°C в течение 1 месяца.

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 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 с адсорбированным в лунках антигеном *Mycoplasma synoviae*.

10.2. В лунки A1-A2 вносят по $0,1 \text{ см}^3$ подготовленного отрицательного контроля.

10.3. В лунки A3-A4 вносят по $0,1 \text{ см}^3$ подготовленного положительного контроля.

10.4. В остальные лунки планшета вносят по $0,1 \text{ см}^3$ испытуемых проб сыворотки крови. Планшет накрывают крышкой и выдерживают 30 мин при температуре 37°C , после чего лунки освобождают от содержимого резким встряхиванием и трижды промывают промывочным буферным раствором (по $0,3 \text{ см}^3$ 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 0,1 см³ рабочего раствора конъюгата, накрывают крышкой и выдерживают 30 мин при температуре 37°C. Трижды повторяют процедуру промывания.

10.6. Во все используемые лунки планшета вносят по 0,1 см³ раствора субстрата, накрывают крышкой и выдерживают 10 мин при температуре от 20°C до 25°C.

10.7. Реакцию останавливают добавлением в каждую используемую лунку по 0,1 см³ 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 0,360-0,880. 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 0,177 считаются отрицательными, выше или равными 0,295 - положительными.

Расчет титра антител.

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

$$\text{Титр} = \text{antilg} (1,3752 \lg (S/P) + 3,6623)$$

Пробы сывороток со значениями титра антител ниже или равными 1:424 считаются отрицательными, больше 1:856 – положительными, промежуточные значения считаются сомнительными.

Обнаружение антител у невакцинированной птицы свидетельствует о возможной циркуляции в стаде полевого штамма *Mycoplasma synoviae*. В таких случаях через

21-30 сут проводят повторное исследование проб сывороток крови, полученных от этих же птиц с целью определения инфицированности стада и контроля результатов оздоровительных мероприятий.

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 Юрьевец.

Инструкция по применению "Набора для выявления антител к *Mycoplasma synoviae* 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 выявления антител к *Mycoplasma synoviae* иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении", утвержденная заместителем руководителя Россельхознадзора от 29 февраля 2006 г.