



УТВЕРЖДАЮ

Заместителя Руководителя
Россельхознадзора

Е.А. Непоклонов

29 октября 2006 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для определения антител
к вирусу инфекционного бронхита кур
иммуноферментным методом

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

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Набор для определения антител к вирусу инфекционного бронхита кур (ИБК) иммуноферментным методом (ИФА).

2. В состав набора входят следующие иммуноспецифические и неспецифические компоненты.

Иммуноспецифические компоненты:

K1 - положительная к вирусу ИБК сыворотка крови кур (положительный контроль), цельная, лиофилизированная, объем $0,5 \text{ см}^3$, или нативная объем $0,2 \text{ см}^3$ - 1 флакон.

K2 - нормальная сыворотка крови кур (отрицательный контроль), не содержащая антител к ИБК, цельная, лиофилизированная, объем $0,5 \text{ см}^3$, или нативная, объем $0,2 \text{ см}^3$ - 1 флакон.

K3 - планшеты для ИФА, с адсорбированным в лунках инактивированным очищенным антигеном вируса ИБК - 2 планшета.

K4 - антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против IgG кур, лиофилизированный, объем $0,5 \text{ см}^3$, или нативный, объем $3,0 \text{ см}^3$ - 1 флакон.

Неспецифические компоненты:

K5 - набор солей для приготовления буферного раствора для испытуемых и контрольных проб, антивидового конъюгата и межэтапных промывок: трис (оксиметил) аминометан, масса 0,97 г (K5.1), трис (оксиметил) аминометан гидрохлорид, масса 6,61 г (K5.2), натрий хлористый, масса 11,7 г (K5.3) - по 1 флакону.

К6 - набор солей для приготовлений субстратного буферного раствора: натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, масса 5,37 г (К6.1), лимонная кислота, масса 1,57 г (К6.2) - по 1 флакону.

К7 - детергент твин-20, объем 1,0 см³ - 1 флакон.

К8 – ортофенилендиамин (ОФД), масса 8 мг - 2 шт. (таблетки) во флаконе.

К9 – перекись водорода, масса 1,5 г - 1 шт. (таблетка) в упаковке.

3. Описание:

- сыворотки - в высушенном виде - сухая пористая масса белого или светло-жёлтого 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;

- набор солей для приготовления буферного раствора для испытуемых и контрольных проб, антивидового конъюгата и межэтапных промывок - порошок белого цвета;

- набор солей для приготовлений субстратного буферного раствора - порошок белого цвета;

- детергент твин-20 - вязкая, тягучая маслянистая жидкость соломенно-жёлтого цвета;

- ортофенилендиамин - таблетка сероватого цвета;

- перекись водорода - таблетка гидроперита белого цвета.

Растворимость в воде высушенных компонентов - в пределах 2-3 мин.

4. Форма выпуска. Компоненты набора расфасовывают в пластиковые и стеклянные флаконы. На флаконы (планшеты) с каждым компонентом наклеивают или наносят несмываемой краской по стеклу этикетки с указанием: наименования организации-производителя и ее товарного знака, названия компонента, объема во флаконе, номера серии, контроля, даты изготовления (мес, год) и рабочего разведения компонента.

Флаконы и планшеты с компонентами набора упаковывают в картонные коробки с наличием гнезд или перегородок, обеспечивающих неподвижность и целостность компонентов.

На коробку наклеивают этикетку, в которой указывают: наименование, товарный знак и адрес организации-производителя, название набора, перечень и количество его компонентов, номера контроля и серии набора, дату изготовления

(мес, год), срок годности, условия хранения, обозначение СТО, знак соответствия и надпись «Для животных».

В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

5. Набор рассчитан на проведение 20 анализов при разведении сывороток от 1:100 до 1:12800.

Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения исследований по мере поступления биологического материала.

6. Срок годности набора 12 месяцев с даты изготовления при хранении в сухом, защищенном от света месте и температуре от 2°C до 8°C.

Компоненты вскрытого набора рекомендуется использовать в течение одного месяца после вскрытия при условии соблюдения правил их хранения (см. п.п. 10.1.-10.6.).

Набор по истечении срока годности не должен применяться.

7. Компоненты набора не токсичны, утилизация наборов, не прошедших контроль, а также с истекшим сроком годности, не требует специальных мер безопасности.

II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

8. 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 взаимодействует с антикуриным IgG, ковалентно связанным с ферментом пероксидазой хрена, который при взаимодействии с субстратом (H_2O_2) в составе бесцветной хромогенной смеси (ОФД) вызывает её окрашивание. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

9. Набор предназначен для выявления специфических антител к вирусу инфекционного бронхита кур в сыворотках крови кур иммуноферментным методом.

Для постановки метода ИФА используют:

- пипетки одно- и восьмиканальные автоматические фиксированного и переменного объема от 0,01 см³ до 0,3 см³ со сменными наконечниками;
- термостат с поддержанием температуры (37,0±0,5)°С;
- холодильник бытовой;
- рН-метр;
- спектрофотометр-ридер любой модели для учета результатов ИФА.

10. Перед приготовлением рабочих растворов набор с компонентами выдерживают 30 мин при температуре от 18°С до 20°С.

10.1. Раствор №1. Содержимое флаконов К5.1, К5.2 и К5.3 растворяют в 1000 см³ дистиллированной воды и измеряют показание рН, которое должно быть в пределах 7,4-7,6.

Затем в этот раствор вносят содержимое флакона К7, получая конечную концентрацию детергента 0,1%. Данный раствор используют для разведения контрольных сывороток, испытуемых проб, антивидового конъюгата и межэтапной промывки. Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2°С до 8°С.

10.2. Раствор №2. Фосфатно-цитратный буферный раствор рН 4,9-5,0. Для приготовления буферного раствора содержимое флакона К6.1 растворяют в 50 см³ дистиллированной воды, содержимое флакона К6.2 также в 50 см³ дистиллированной воды. Затем смешивают 24,3 см³ раствора К6.1 с 25,7 см³ раствора К6.2, добавляют 50 см³ дистиллированной воды. Полученный раствор должен иметь рН 4,9-5,0, при необходимости добавляют кислый (К6.2) или щелочной (К6.1) компоненты. Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2°С до 8°С.

10.3. Раствор №3. Содержимое флакона К1 растворяют в 0,5 см³ раствора №1. Раствор рекомендуется хранить при температуре минус 10°С. Сыворотка в нативном виде готова к использованию.

10.4. Раствор №4. Содержимое флакона К2 с нормальной сывороткой крови кур растворяют в 0,5 см³ раствора №1. Раствор рекомендуется хранить при температуре минус 10°С. Сыворотка в нативном виде готова к использованию.

10.5. Раствор №5. Рабочий раствор конъюгата. Содержимое флакона с лиофилизированным конъюгатом растворяют в 0,5 см³ буферного раствора для разведения проб. Раствор конъюгата рекомендуется хранить при температуре минус 10°С. Возможно использование после однократной разморозки. Конъюгат в

нативном виде готов к использованию. Для приготовления рабочего разведения концентрат конъюгата разводят буферным раствором до разведения, указанного на этикетке флакона, рабочий раствор готовят перед использованием (таблица 1).

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
Концентрат конъюгата, см ³	0,200	0,100	0,050	0,033	0,025	0,020
Буферный раствор для разведения проб, см ³	10	10	10	10	10	10

10.6. Раствор №6. 1 таблетку гидроперита растворяют в 40,0 см³ дистиллированной воды, получая 1% раствор. Раствор рекомендуется хранить в защищённом от света месте при температуре от 2°C до 8°C.

10.7. Раствор №7. Субстратно-индикаторная смесь. Содержимое флакона К8 (1 таблетку) растворяют в 10,0 см³ раствора №2, встряхивают до полного растворения и добавляют 0,4 см³ раствора №6. Готовят непосредственно перед использованием. Хранению не подлежит.

11. Постановка реакции

11.1. Для исследования в лабораторию доставляют птицеводы сыворотки крови кур от 20 голов (по 0,2-0,3 см³). Пробы сывороток хранят в морозильной камере бытового холодильника (минус 20°C) в течение 50-60 сут, при температуре 2°C до 8°C не более 4-х сут.

Из комплекта набора берут планшет (К3), в лунках которого адсорбирован антиген вируса ИБК, и используют для постановки иммуноферментного метода.

11.2. Разведение сывороток. Образцы исследуемых проб сывороток крови разводят 1:100 раствором №1. С этой целью к 1,0 см³ раствора №1 добавляют 0,01 см³ сыворотки крови кур и перемешивают.

11.3. В лунки рядов планшета В1-12... Н1-12 вносят по 0,1 см³ раствора №1, а в лунки А2-11 вносят по 0,2 см³ исследуемых проб сывороток крови, приготовленных по п. 11.2., и проводят раститровку по вертикальным рядам, начиная с 1:100 до 1:12800. В лунки А1 и А12 вносят разведения 1:100 контрольных (отрицательной п. 10.4. и положительной п. 10.3.) сывороток и также

проводят раститровку по вертикальным рядам. Из последних лунок Н1-Н12 удаляют по $0,1 \text{ см}^3$.

11.4. При обнаружении в испытуемых пробах титров антител 1:12800 и выше проводят раститровку по горизонтальным рядам планшета.

11.5. Планшет осторожно встряхивают, закрывают крышкой и переносят в термостат на $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ на 30 мин. Затем лунки планшета освобождают от содержимого путем встряхивания и трехкратно промывают раствором №1.

11.6. Готовят раствор №5 по п. 10.5. и вносят во все лунки планшета по $0,1 \text{ см}^3$, затем опять помещают в термостат на 30 мин и промывают как в п. 11.5.

11.7. Готовят раствор №7 по п. 10.7. и вносят во все лунки по $0,1 \text{ см}^3$. Оставляют при комнатной температуре в темном месте 3-5 мин. **Останавливают реакцию добавлением в каждую лунку $0,05 \text{ см}^3$ серной кислоты, приготовленной путем растворения 2 см^3 концентрированной серной кислоты в 18 см^3 дистиллированной воды (в наборе отсутствует).**

12. Учет результатов реакции

Учет результатов анализа проводят после остановки реакции одним из способов: визуально - по интенсивности окрашивания содержимого лунок планшета или инструментально - с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом при длине волны 492 нм.

При визуальном способе учета первоначально проводят оценку результатов по контрольным лункам планшета: положительный контроль при раститровке окрашивается в желтый цвет различной интенсивности. В лунках с отрицательным контролем раствор остается неокрашенным или незначительно желтеет. При визуальном учете сравнивают окраску содержимого лунок планшета испытуемых проб с окраской лунок контрольных образцов. За титр испытуемой сыворотки принимают последнее разведение ее, при котором наблюдают видимое глазом цветное окрашивание, более интенсивное по сравнению с отрицательным контролем.

Инструментальный фотометрический учет результатов анализа позволяет количественно оценить титры специфических антител в исследуемых пробах путем измерения значений оптической плотности (ОП 492 нм). Конечным разведением испытуемой сыворотки считается последнее ее разведение, в котором оптическая плотность превышает таковую отрицательного контроля в 2,0-2,1 раза. Отрицательными будут считаться пробы сывороток крови, титры которых

1:400 и ниже. Положительными будут считаться пробы сывороток крови, титры которых 1:800 и выше. Промежуточные значения будут 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 вирусу инфекционного бронхита кур 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 1:800 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.

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.

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

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

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

14. 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 под краном.

15. В связи с высокой токсичностью ОФД, приготовление субстратно-индикаторной смеси проводить в резиновых перчатках, избегая попадания на кожу и слизистые оболочки.

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 набора для определения антител к вирусу инфекционного бронхита кур иммуноферментным методом разработана организацией-производителем ФГУ "Федеральный центр охраны здоровья животных" (ФГУ «ВНИИЗЖ»), 600901, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевец.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ «ВГНКИ».

Регистрационный номер ПВР-1-4.9/00206