

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

«03» июля 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

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

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Набор для определения антител к вирусу ньюкаслской 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 ньюкаслской болезни (НБ) – 2 штуки;
- положительная сыворотка крови кур к вирусу НБ (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 НБ, 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 в виде концентрированного 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 – 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-жёлтого 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 микропланшетов - бесцветную прозрачную жидкость.
- субстрат - зеленоватую прозрачную жидкость.
- "стоп-раствор" - бесцветную прозрачную жидкость. Допускается выпадение белого хлопьевидного осадка, исчезающего после прогрева при температуре 37°C в течение 15 мин.

Планшеты запаяны в пакет из целлофана или фольгированной бумаги, в который 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 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 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. 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.).

Срок годности набора 12 мес от даты изготовления при хранении и транспортировании в сухом темном 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 минут. 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) вызывает ее окрашивание. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Набор предназначен для:

- контроля за распространением ньюкаслской болезни в популяциях кур;
- оценки эффективности иммунизации птицепоголовья против данного заболевания;
- ретроспективной диагностики НБ 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.

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, 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
Раствор №1, 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 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°C) в течение 50-60 сут, при температуре 4°C – не более 4-х сут.

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

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 крови со значениями S/P ниже или равными 0,1530 считаются отрицательными; 0,1531–0,2411 – сомнительными, больше или равными 0,2412 – положительными.

Расчет титра антител

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

$$Tump = \text{antilg} (1,514 (\lg S/P) + 3,634)$$

Пробы сывороток крови, содержащие антитела в титре 1:250 и ниже считаются отрицательными, 1:251-1:499 – сомнительными, больше 1:500 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 ньюкаслской болезни при напряженности иммунитета 90 и более процентов (т.е. если в 90 и более процентах исследованных проб сывороток крови титр антител 1:500 и выше).

Обнаружение антител у невакцинированной птицы свидетельствует о возможной циркуляции в стаде полевого вируса НБ. 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 НБ не является основанием для объявления в хозяйстве неблагополучия по данному заболеванию, но предусматривает установление за птицей тщательного наблюдения, проведения систематических серологических и вирусологических исследований.

V. 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 ньюкаслской 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 ньюкаслской болезни иммуноферментным способом при тестировании сывороток в одном разведении", утвержденная заместителем руководителя Россельхознадзора от 27 июня 2007 г.