

Набор для выявления антител к вирусу ньюкаслской болезни (НБ) методом иммуноферментным анализом (ИФА)

Общие сведения

В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

- полистироловые 96-луночные микропанели с адсорбированными в лунках инактивированным антигеном: НБ — по 2 микропанели;
- буфер для разведения испытуемых и контрольных проб;
- промывочный буфер;
- стандарт — (сыворотка крови кур с повышенным содержанием специфических антител к антигену НБ);
- положительный контроль (сыворотка крови кур, содержащая специфические антитела к антигену НБ);
- отрицательный контроль (сыворотка крови кур, не содержащая специфических антител к антигену НБ);
- антивидовой конъюгат (антитела к IgG кур, меченые щелочной фосфатазой);
- субстрат;
- стоп-раствор.

Набор рассчитан на анализ 88 испытуемых проб на каждой микропанели. Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения нескольких исследований по мере поступления биологического материала.

Для исследования используют индивидуальные сыворотки крови птиц без признаков гемолиза и бактериальной контаминации объемом 0,3–0,5 см³.

Следует помнить, что ИФА является высокочувствительным методом, поэтому ошибки, связанные с подготовкой образцов, проведением инкубационного, температурного и промывочного режимов могут быть причиной получения недостоверных результатов.

Перед началом работы микропанели и все компоненты набора выдерживают 20–30 мин при температуре 22–27°C. Не использованные реагенты убирают в холодильник (2 — 8°C) сразу же после проведения исследования.

Принцип метода

Вирусный антиген, адсорбированный в лунках полистироловой микропанели, связывается со специфическими антителами, присутствующими в сыворотке крови, в результате чего формируется комплекс антиген-антитело. Полученный иммунный комплекс выявляется после взаимодействия с антивидовым конъюгатом (антитела к IgG кур, меченые щелочной фосфатазой), фермент которого, после добавления субстрата, вызывает разложение субстрат-индикаторного раствора и образование растворимого окрашенного продукта. При этом интенсивность окраски раствора в лунке микропанели пропорциональна содержанию антител в исследуемом материале.

Порядок применения

Приготовление рабочих растворов

Буфер для разведения проб. Концентрированный раствор буфера разводят в 4 раза дистиллированной или деионизованной водой.

Промывочный буфер. Концентрированный раствор буфера разводят в 20 раз дистиллированной или деионизованной водой.

Конъюгат, субстратный раствор и стоп-раствор — готовы к употреблению.

Подготовка испытуемых сывороток и контрольных проб

Все испытуемые сыворотки, стандарт, положительный и отрицательный контроли разводят в соотношении 1:400 буфером для разведения проб, используя для каждого образца новый наконечник.

Постановка реакции

В лунки микропанели в двух повторах вносят по 100 мкл приготовленных контрольных проб: буфер для разведения проб, отрицательный контроль, положительный контроль, стандарт.

В остальные лунки микропанели вносят по 100 мкл приготовленных в разведении 1:400 испытуемых проб сыворотки крови и инкубируют 30 мин при температуре 20-30°C.

После инкубации лунки освобождают от содержимого резким встряхиванием и трижды промывают промывочным буфером (по 300 мкл в каждую лунку), каждый раз выдерживая лунки с буфером не менее 30 сек. При этом не рекомендуется оставлять лунки сухими в промежутках между промывками. Затем жидкость окончательно удаляют, микропанель подсушивают постукиванием по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

Затем в лунки микропанели вносят по 100 мкл конъюгата и выдерживают 30 мин при температуре 28-38°C.

После инкубации проводят процедуру промывания лунок.

Далее в используемые лунки микропанели вносят по 100 мкл субстрата и выдерживают 30 мин при температуре 20-30°C.

После чего реакцию останавливают, добавляя в каждую используемую лунку по 100 мкл стоп-раствора.

Сразу же после остановки реакции проводят измерение оптической плотности (О.П.) раствора в каждой лунке на спектрофотометре (ридер) с вертикальным лучом света при длине волны 405 нм и осуществляют оценку реакции с помощью компьютерной программы «ИФА-АВИВАК».

Условия и срок хранения

Срок годности компонентов набора — 12 месяцев от даты изготовления при хранении их в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C.