

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
Россельхознадзора

Н.А.Власов

«dd» 2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления
антител к вирусу гриппа птиц (ВГП)
иммуноферментным анализом (ИФА)

(организация-производитель – ООО «НПП АВИВАК», Ленинградская обл.)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

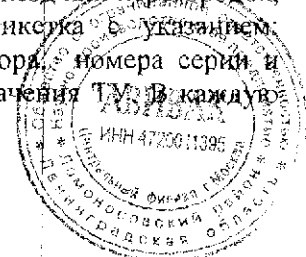
1. Набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц (ВГП) иммуноферментным анализом (ИФА).

2. В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

1. **полистироловые 96-луночные микропанели** с адсорбированным в лунках инактивированным антигеном ВГП – 2 микропанели;
2. **буфер для разведения испытуемых и контрольных проб** (концентрированный 4-кратный раствор ТРИС-ЭДТА буфера с добавлением пищевого красителя) - красная прозрачная жидкость, 20,0 см³ -3 флакона;
3. **промывочный буфер** (концентрированный 20-кратный раствор ТРИС-буфера) - бесцветная или с желтоватым оттенком прозрачная жидкость, 25,0 см³ -2 флакона;
4. **стандарт** – (сыворотка крови кур с повышенным содержанием специфических антител к антигену ВГП) - прозрачная жидкость красного цвета, 0,1 см³ - 1 пробирка;
5. **положительный контроль** (сыворотка крови кур, содержащая специфические антитела к антигену ВГП) - прозрачная жидкость красного цвета, 0,1 см³ - 1 пробирка;
6. **отрицательный контроль** - (сыворотка крови кур, не содержащая специфических антител к антигену ВГП), прозрачная жидкость красного цвета, 0,1 см³ - 1 пробирка;
7. **антивидовой конъюгат** (антитела к IgG кур, меченые щелочной фосфатазой) - прозрачная жидкость зеленого цвета, 22,0 см³ - 1 флакон.
8. **субстрат** – (раствор *p*-нитрофенилфосфата) - бесцветная или с желтоватым оттенком прозрачная жидкость, 22,0 см³ - 1 флакон;
9. **стоп-раствор** (3,0 М NaOH), прозрачная бесцветная жидкость, 22,0 см³ - 1 флакон.

3. Компоненты набора расфасовывают в пластиковые и стеклянные, герметично укупоренные флаконы или пробирки (типа эппендорф) соответствующей вместимости. На флаконах (пробирках) с компонентами должны быть этикетки с указанием: организации-производителя и его товарного знака, номера компонента, наименования компонента, количества во флаконе, номера серии и контроля, срока годности (месяц, год). Микропанели укупоривают в индивидуальные полиэтиленовые пакеты с влагопоглотителем и снабжают этикеткой с указанием: организации-производителя и ее товарного знака, наименования антигена, адсорбированного в лунках микропанели, номера серии и контроля, срока годности (месяц, год).

4. Компоненты набора упакованы в картонные коробки с наличием гнезд или перегородок, обеспечивающих целостность флаконов. На коробке должна быть этикетка с указанием: организации-производителя и ее товарного знака, полного названия набора, номера серии и контроля набора, срока годности (месяц, год), условий хранения и обозначения ТМ. В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.



Handwritten signature

5. 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.

6. Срок годности компонентов набора - 12 месяцев от даты изготовления при хранении их в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C. Запрещено смешивать компоненты наборов разных серий и использовать набор по истечении срока годности. **Не допускается замораживание компонентов!**

При нарушении целостности и укупорки флаконов, упаковки микропанелей и пакетов, изменении цвета содержимого, наличии плесени и посторонней примеси, при отсутствии этикеток, а также в случае не использования в пределах срока годности набор выбраковывают, а иммуноспецифические компоненты обеззараживают кипячением в течение 15 мин. Неиспользованные планшеты дезинфицируют в 3% растворе хлорамина.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

7. 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.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Подготовка к исследованию

8.1. Для исследования в лабораторию доставляют из птицеводческих хозяйств индивидуальные сыворотки крови птиц без признаков гемолиза и бактериальной контаминации объемом 0,3-0,5 см³. Сыворотки можно хранить при температуре 4°C не более 3-х суток или при температуре минус 20°C в течение 50-60 суток.

8.2. Для постановки ИФА необходимы одно- и многоканальные автоматические микропипетки разных объемов со сменными наконечниками, мерная лабораторная посуда, пробирки для разведения образцов, дистиллированная или деионизованная вода, спектрофотометр (ридер) с фильтром на 405 нм.

8.3. 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.

8.4. 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.

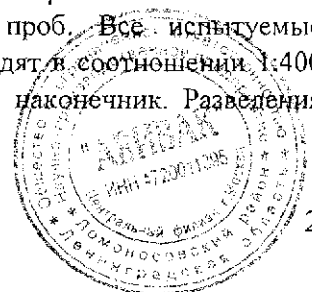
8.5. Приготовление рабочих растворов

8.5.1. Буфер для разведения проб. Концентрированный раствор буфера разводят в 4 раза дистиллированной или деионизованной водой и тщательно перемешивают (например, для получения 120 см³ буфера к 30 см³ концентрата добавляют 90 см³ воды).

8.5.2. Промывочный буфер. Концентрированный раствор буфера разводят в 20 раз дистиллированной или деионизованной водой и тщательно перемешивают (например, для получения 500 см³ буфера к 25 см³ концентрата добавляют 475 см³ воды).

8.5.3. Конъюгат, субстратный раствор и стоп-раствор – готовы к употреблению.

8.5.4. 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. Разведения готовят с использованием одного из двух рекомендованных методов:



Метод №1. В пробирку, содержащую 1000 мкл (1 см³) буфера для разведения проб, вносят 10 мкл образца и тщательно пипетируют. Из полученного препарата берут 60 мкл раствора, смешивают со 180 мкл буфера для разведения проб и тщательно пипетируют. Вносят 100 мкл этого раствора (искомое разведение 1:400) в лунку микропанели для исследования.

Метод №2. В пробирку, содержащую 1000 мкл (1 см³) буфера для разведения проб, вносят 2,5 мкл образца и тщательно пипетируют. Берут 100 мкл этого раствора (искомое разведение 1:400) и вносят в лунку микропанели для исследования.

9. Постановка реакции

9.1. Из пакета извлекают микропанель, сенсibilизированную антигеном.

В лунки микропанели в двух повторах вносят по 100 мкл приготовленных контрольных проб (п. 8.5.4.): 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.

9.2. После инкубации лунки освобождают от содержимого резким встряхиванием и трижды промывают **промывочным буфером** (п. 8.5.2.) (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.

9.3. Во все используемые лунки микропанели вносят по 100 мкл конъюгата и выдерживают 30 мин при температуре 20-30°C.

9.4. После инкубации проводят процедуру промывания лунок по п.9.2.

9.5. Во все используемые лунки микропанели вносят по 100 мкл **субстрата** и выдерживают 30 мин при температуре 20-30°C.

9.6. Реакцию останавливают добавлением в каждую используемую лунку по 100 мкл **стоп-раствора**.

9.7. **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.

10. Оценка и интерпретация результатов реакции

10.1. Вначале проводят оценку О.П. лунок с буфером, отрицательным и положительным контролями и стандартом. Если каждая проба исследовалась в двух лунках, определяют среднее значение О.П. для каждого показателя. Результаты реакции считаются достоверными и могут быть учтены, если контрольные показатели соответствуют следующим критериям:

- среднее значение О.П. буфера и отрицательного контроля < 0,4;
- среднее значение О.П. стандарта – среднее О.П. отрицательного контроля ≥ 0,7.
- EU положительного контроля > 25 (вычисляется по формуле, приведенной ниже).

Если полученные значения выходят за пределы этих показателей, результаты считаются недостоверными и реакцию повторяют.

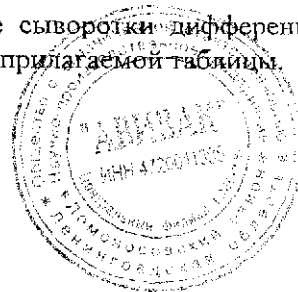
10.2. Далее проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми пробами. Если проба исследовалась в двух лунках, то для нее определяют среднее значение О.П.

Относительное содержание антител в исследуемых образцах выражается в международных ИФА единицах (EU) и определяется по отношению значения О.П. испытуемой пробы к значению О.П. стандарта по формуле:

$$EU \text{ пробы} = \frac{\text{среднее О.П. пробы} - \text{среднее О.П. отр. контроля}}{\text{среднее О.П. стандарта} - \text{среднее О.П. отр. контроля}} \times 100,$$

где 100 является EU стандарта.

10.3. Интерпретация результатов ИФА. Испытуемые сыворотки дифференцируются в зависимости от установленного значения EU с использованием прилагаемой таблицы.



Значения EU	Интерпретация результата
< 15	Нет специфических антител (отрицательная реакция)
15 – 35	Низкий уровень специфических антител (слабо положительная реакция).
35 – 75	Выраженный уровень специфических антител (положительная реакция)
> 75	Высокий уровень специфических антител (сильная положительная реакция)

Пример расчета содержания антител к ВГП:

Контрольные показатели О.П.405 нм: буфера - 0,095; отрицательного контроля - 0,100; положительного контроля - 1,447; стандарта - 2,027. Все показатели соответствуют требуемым критериям. О.П.405 нм испытуемых сывороток: №1- 1,358 и №2- 0,188.

$$EU(1) = \frac{1,358 - 0,100}{2,027 - 0,100} \times 100 = 65 \quad EU(2) = \frac{0,188 - 0,100}{2,027 - 0,100} \times 100 = 4,6$$

Таким образом, в исследуемой пробе сыворотки крови №1 зарегистрирован выраженный уровень антител к ВГП (положительная реакция), в сыворотке крови №2 специфических антител нет, что является отрицательным результатом ИФА.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

11. Работу с химическими компонентами набора следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. При попадании их на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промывать это место большим количеством водопроводной воды.

12. Запрещается прием пищи и воды, курение в помещении, где проводятся работы с компонентами набора.

13. Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана ООО «НПП АВИБАК». Юридический адрес и адрес производства: 188502 Ленинградская обл., Ломоносовский район, д. Горбунки.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ ВГНКИ.
Регистрационный номер ПВР-1-1.6/01625