

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни (болезни Гамборо) в сыворотке крови цыплят методом иммуноферментного анализа
«Анти-IBDV-ИФА-Ab»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни (болезни Гамборо) в сыворотке крови цыплят методом иммуноферментного анализа «Анти-IBDV-ИФА-Ab» (далее по тексту – набор реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab»), «Анти-IBDV-ИФА-Ab», набор реагентов) предназначен для определения антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни (болезни Гамборо) в сыворотке крови цыплят методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа.

Для профессионального применения в ветеринарной практике.

Болезнь Гамборо, или инфекционная бурсальная болезнь (ИББ) – высококонтагиозное иммуносупрессивное вирусное заболевание, возникающее преимущественно у цыплят 3-6 недельного возраста и характеризующееся поражением фабрициевой сумки, нефрозом, внутримышечными кровоизлияниями и диареей. Вызывается РНК-содержащим безоболочечным вирусом **Infectious Bursal Disease Virus (IBDV)** из семейства Birnaviridae. Основными мишенями являются клетки лимфоидного ряда, особенно В-клетки.

Источник инфекции - больные цыплята. IBDV передается при совместном содержании больных и здоровых цыплят через загрязненные корма, воду, подстилку, помет; кроме того— людьми, другими видами птиц, насекомыми. Вирус проникает в организм через слизистые оболочки носовой, ротовой полостей, конъюнктиву; в естественных условиях птица заражается алиментарным путем. Тяжесть симптомов и поражений зависит от вирулентности вируса, породы птицы и ее иммунного статуса.

2. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Причиной получения некорректных результатов может быть несоблюдение требований и процедур, описанных в настоящей инструкции, в том числе: нарушение целостности упаковки при транспортировании, использование набора с истекшим сроком годности или условий хранения набора, нарушение условий хранения и транспортирования образцов.

3. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab» выпускается в одной комплектации и рассчитан на 96 определений, включая контрольные образцы. В случае дробного применения необходима обязательная постановка всех контрольных образцов для каждого отдельного анализа. Количество дробных постановок лимитировано количеством контрольных образцов.

Состав набора реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab»

Таблица 1

Сокращение	Компонент набора реагентов	Объем во флаконе	Кол-во
П	Планшет - планшет разборный с иммобилизованными антигенами IBDV	-	1 шт
ПК	Положительный контрольный образец	1 мл	1 фл
ОК	Отрицательный контрольный образец	1 мл	1 фл
РР	Раствор для разведения	20 мл	1 фл
РИ	Раствор для инкубации	20 мл	1 фл.
КГ	Раствор конъюгата	12 мл	1 фл
РХ	Раствор хромогена	12 мл	1 фл
ПБ 20х	Промывочный буфер 20х	30 мл	1 фл
Стоп	Стоп-раствор	12 мл	1 фл
-	Планшет для разведения образцов	-	1 шт
-	Ванночка для реагентов одноразовая	-	2 шт
-	Пленка для заклеивания лунок микропланшета одноразовая	-	2 шт

4. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Функциональные характеристики

№	Наименование показателя	Характеристики и нормы
4.1	Среднее значение ОП в лунках, содержащих ПК	превышает 0,2 ед.опт.пл.
4.2	Соотношение ОП _{ср} (ПК)/ОП _{ср} (ОК)	> 3
4.3	Чувствительность*	100 %
4.4	Специфичность*	100 %
4.5	Воспроизводимость: - коэффициент вариации в одной аналитической серии (повторяемость)	≤ 8%

* - определяются с использованием панели предприятия «IBDV-ИФА-ПП», содержащей и не содержащей антитела к IBDV.

Принцип действия. В основе принципа действия набора реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab» лежит метод непрямого твердофазного иммуноферментного анализа.

На поверхности полистиролового планшета иммобилизованы антигены IBDV. На первой стадии, во время инкубации в лунках планшета исследуемых проб и контрольных образцов происходит связывание антител (при наличии в образце) с антигеном с образованием иммунных комплексов. По окончании инкубации во время промывки происходит удаление всех несвязавшихся компонентов из зоны реакции.

На второй стадии антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, связываются с ранее образовавшимися иммунными комплексами. По окончании инкубации во время промывки происходит удаление всех несвязавшихся компонентов из зоны реакции.

При добавлении раствора хромогена происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации антител в исследуемых и контрольных образцах. После остановки реакции стоп-раствором измеряется оптическая плотность (ОП) раствора в лунках. Результат анализа образца представляется в виде коэффициента позитивности и титра антител, в соответствии с величиной которого образцы могут быть интерпретированы как положительные или отрицательные.

5. ОПИСАНИЕ ПОРЯДКА ВЫПОЛНЕНИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ

Выявление суммарных антител к IBDV в исследуемых образцах состоит из следующих этапов:

1. Подготовка образцов для анализа
2. Проведение ИФА
3. Интерпретация результатов

Контрольные материалы, входящие в состав теста:

В состав набора реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab» входят положительный и отрицательный контрольные образцы, которые используются для оценки результатов анализа и правильности прохождения анализа при рутинной постановке.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab» требуются следующие оборудование и материалы:

- дозаторы механические 1-канальные с варьируемым объемом дозирования;
- дозаторы механические 8-канальные с варьируемым объемом дозирования;
- одноразовые наконечники для дозаторов;
- цилиндр мерный;
- автоматический промыватель для иммунологических планшетов;
- анализатор иммунологический (спектрофотометр), позволяющий проводить измерение оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- холодильник бытовой;
- емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора;
- СИЗ.

7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И СРОК ГОДНОСТИ НАБОРА

Срок годности набора реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab» - 12 месяцев.

7.1. Срок годности и условия хранения вскрытых компонентов и рабочих растворов набора реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab».

Все компоненты набора реагентов после вскрытия хранить в упаковке предприятия-изготовителя в течение 1 месяца при температуре от +2 °С до +8 °С.

7.2. Транспортировка.

Набор реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab» можно транспортировать в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы при температуре от +2 до +8 °С. Допускается транспортирование при температуре +25 - +28 °С в течение 3 суток.

Наборы, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

7.3. Условия хранения. Набор реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab» хранить при температуре от +2 °С до +8 °С. Наборы, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Разрешается применение набора только строго по назначению, согласно данной инструкции и в пределах обозначенного срока годности.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- При проведении анализа не допускается использование компонентов из наборов разных серий, других фирм-производителей.
- В процессе работы обязательно использование индивидуальных средств защиты: одноразовых перчаток, лабораторных халатов. Все использованные материалы, инструменты и оборудование, рабочее место дезинфицировать в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
- При работе с набором следует избегать контакта компонентов набора с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При контакте следует немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

9. ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Исследуемые образцы – негемолизированная, прозрачная, нелипемичная сыворотка крови.

Пробы крови отбирают индивидуально путём:

- декапитации цыплят в возрасте менее 10 дней;
- от более старших цыплят и взрослых птиц:
 - а) из подкрыльцовой вены;
 - б) при забое птицы.

Пробы крови отбирают из подкрыльцовой вены в пробирки, увлажнённые физиологическим раствором. Кровь выдерживают до образования сгустка при комнатной температуре, или в термостате при 37°C в течение 1-2 часов, затем обводят иглой или пастеровской пипеткой, отслаивая сгусток крови от стенок пробирки, и оставляют на 16-18 часов при температуре 2-4°C. Образовавшуюся прозрачную без признаков гемолиза сыворотку отбирают с помощью пипетки в отдельные, чистые пробирки.

Отбор крови допускается проводить с помощью иглы и шприца (или вакуумной пробирки).

Рекомендуется проводить центрифугирование проб крови для получения сыворотки в течение 10-15 минут при 1000 об/мин для осаждения свободных эритроцитов.

Пробы транспортируются во влагонепроницаемой таре, в контейнере с хладоэлементами или в термосе со льдом. Допускается однократное замораживание сывороток.

При транспортировке проб соблюдают установленные ветеринарно-санитарные правила и меры безопасности, предъявляемые к транспортировке биологических материалов, содержащих инфекционные агенты.

Если немедленное исследование проб невозможно, допускается сохранять образцы на протяжении 4 дней при температуре 4°C.

При необходимости, для увеличения срока хранения, диагностические образцы и/или изолят помещают в морозильную камеру с температурой -80°C.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

10.1 Требования к проведению анализа.

Несоблюдение описанных ниже требований может привести к искажению результатов анализа.

10.1.1. Не использовать компоненты с истекшим сроком годности.

10.1.2. При использовании набора реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab» для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что количество независимых экспериментов ограничено объемом компонентов.

- 10.1.3. Оба контрольных образца должны использоваться в каждом анализе.
- 10.1.4. Для растворов конъюгата и хромогена использовать одноразовые емкости и наконечники для дозаторов.
- 10.1.5. Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.
- 10.1.6. Не использовать повторно ванночки для внесения реагентов.
- 10.1.7. Пленка для заклеивания лунок планшета является одноразовой и повторному использованию после снятия не подлежит. При использовании части набора необходимо отрезать кусок пленки нужного размера.
- 10.1.8. При проведении анализа не допускается использование компонентов из наборов разных серий, а также других фирм-производителей.

10.2. Подготовка компонентов набора реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab» к проведению анализа

- 10.2.1. Перед проведением анализа все компоненты набора необходимо выдержать при температуре от +18°C до +25°C не менее 60 минут.
- 10.2.2. Все компоненты набора кроме промывочного буфера (ПБ 20х) – готовы к использованию.

10.3. Подготовка образцов к анализу

- 10.3.1. Исследуемые пробы тщательно ресуспензировать пипетированием (или перемешать на вортексе).
- 10.3.2. Предварительное разведение образцов проводить в планшетах для разведения образцов. В лунки планшета для разведения образцов внести по 190 мкл раствора для разведения (РР) и добавить по 10 мкл исследуемых образцов, тщательно перемешать пипетированием. При добавлении образца происходит изменение оттенка раствора в лунке.
- 10.3.3. Образцы разводятся непосредственно перед анализом, хранению в разведенном виде не подлежат.

10.4. Приготовление рабочих растворов

Приготовление 1-кратного промывочного раствора.

Перемешать содержимое флакона с ПБ 20х. Необходимое количество ПБ 20х развести в 20 раз очищенной (дистиллированной) водой, например, 10 мл ПБ 20х + 190 мл воды очищенной.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

10.5. Проведение анализа.

- 10.5.1. Перед проведением анализа все компоненты набора необходимо выдержать при температуре от +18°C до +25°C не менее 60 минут.
- 10.5.2. Подготовить планшет (П).
- 10.5.3. Внести по 190 мкл раствора для инкубации (РИ) в лунки, предназначенные для внесения анализируемых образцов.
- 10.5.4. Внести по 100 мкл положительного контрольного образца (ПК) в дубликатах и отрицательного контрольного образца (ОК) в дубликатах в лунки планшета.

ВНИМАНИЕ! Контрольные образцы (ПК) и (ОК) готовы к использованию и разведению не подлежат!

10.5.5. После контрольных образцов, в лунки с раствором для инкубации (РИ), предназначенные для исследуемых образцов, без задержки внести по 10 мкл предварительно разведенных образцов (см. п. 10.3.2), перемешать пипетированием.

ВНИМАНИЕ! После внесения **ОБЯЗАТЕЛЬНО** аккуратно перемешать содержимое лунок постукиванием по краю планшета в течение 30 секунд!

10.5.6. Порядок внесения контрольных образцов и исследуемых (предварительно подготовленных) образцов представлен в Таблице 2.

Таблица 2. Порядок внесения образцов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ПК	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
B	ПК	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
C	ОК	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
D	ОК	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
E	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
F	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
G	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
H	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92

ВНИМАНИЕ! Время внесения не должно превышать 15 минут. При выполнении последующих пунктов инструкции не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

10.5.7. Заклеить лунки планшета пленкой и инкубировать **30 минут** при комнатной температуре (+18°C ...+25°C).

10.5.8. По окончании инкубации удалить пленку, удалить содержимое лунок в специальную емкость для сбора инфицированного материала и промыть лунки пять раз с шейкированием в течение 5 сек между заполнением и опорожнением лунок, не допуская переливания промывочного раствора через края лунок, и не касаясь лунок наконечниками. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 10.4, с последующим удалением жидкости в емкость для инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием микропланшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге до исчезновения следов наличия жидкости в лунках. При использовании автоматического промывающего устройства тщательно следить за точностью наполнения и полнотой удаления жидкости из лунок микропланшета.

10.5.9. Во все лунки микропланшета внести по 100 мкл раствора конъюгата (КГ).

10.5.10. Заклеить лунки микропланшета пленкой и инкубировать **30 минут** при комнатной температуре (+18°C ...+25°C).

10.5.11. По окончании инкубации содержимое лунок микропланшета собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть все лунки промывочным раствором и удалить влагу как описано в п.10.5.8.

10.5.12. Во все лунки микропланшета внести по 100 мкл раствора хромогена (РХ). Защищенный от света микропланшет инкубировать **15 минут** при комнатной температуре (+18°C ...+25°C).

10.5.13. Реакцию остановить добавлением во все лунки микропланшета 100 мкл Стоп.

10.6. Регистрация результатов

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП), основной фильтр — 450 нм.

10.7. Интерпретация результатов ИФА

10.7.1. Рассчитать средние значения ОП в лунках с положительным контрольным образцом (ПК) и отрицательным контрольным образцом (ОК) по формуле (1):

$$\text{ОП}_{\text{ср}} = \frac{\text{ОП1} + \text{ОП2}}{2} \quad (1)$$

где ОП ср – среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОК)/положительным контрольным образцом (ПК) (ед.опт.плотн.);

ОП1, ОП2 – значения оптической плотности в каждой лунке с ОК/ПК (ед.опт.плотн.).

10.7.2. Результаты анализа следует учитывать только при соблюдении следующих условий:

- среднее значение ОП в лунках А1-В1 (ОП ПК) превышает 0,200 ед.опт.плотн.;

- соотношение ОП_{ср} (ПК)/ОП_{ср} (ОК) > 3

Вычислить коэффициент позитивности (КП) для каждого исследуемого образца по формуле:

$$\text{КП} = \frac{\text{ОП}_{\text{обр}} - \text{ОП}(\text{ОК})}{\text{ОП}(\text{ПК}) - \text{ОП}(\text{ОК})} \quad (2)$$

где ОП_{обр} – значение ОП в лунке с образцом

Рассчитать титр анти-IBDV антител по формулам (3), (4):

$$\text{Log}_{10}(\text{титр}) = 1,3 * \text{log}_{10}(\text{КП}) + 3,448 \quad (3)$$

$$\text{Титр} = 10^{\text{log}_{10}(\text{титр})} \quad (4)$$

10.7.3. Полученные результаты интерпретируются следующим образом:

Интерпретация полученных значений в исследуемом образце

Коэффициент позитивности (КП)	Титр антител	Интерпретация (иммунный статус по IBDV)
< 0,3 Ед/мл	< 600	отрицательный
> 0,3 Ед/мл	> 600	положительный

Произведено по заказу ООО «ЦБО Микроэкологии», рекламации на качество набора реагентов «Анти-IBDV-ИФА-Ab» направлять по адресу: 121205, г. Москва, Территория инновационного центра "Сколково", Большой бульвар, д. 42, стр. 1, эт/пом/раб 0/157/5

Генеральный директор
ООО «ЦБО Микроэкологии»



Стрельников А.Д.

Приложение А. Краткая схема постановки анализа

№ п/п	Этап	Описание	Температура, длительность	Примечание
1	Подготовка компонентов	Все компоненты необходимо выдержать при комнатной температуре	не менее 60 мин при температуре (+18°C ...+25°C)	-
2	Приготовление 1-кратного промывочного раствора	Приготовление 1-кратного промывочного раствора (см.п.5.4)	+18°C ...+25°C	-
3	Подготовка образцов	В лунки планшета для разведения образцов внести по 190 мкл РР, добавить по 10 мкл исследуемых образцов, тщательно перемешать пипетированием (см. п.5.3.2)	+18°C ...+25°C	При добавлении образца происходит изменение оттенка раствора в лунке.
4	Внесение РИ	В лунки иммуносорбента, предназначенные для анализируемых образцов, внести по 190 мкл РИ	Время внесения не должно превышать 15 минут	-
5	Внесение ПК, ОК	Внести по 100 мкл контрольных образцов ПК и ОК в лунки иммуносорбента		После внесения перемешать содержимое лунок постукиванием по краю планшета в течение 30 секунд!
6	Внесение предварительно подготовленных образцов	Внести по 10 мкл предварительно подготовленных образцов в лунки планшета с РИ , перемешать пипетированием		
7	ВНИМАНИЕ! После внесения ОБЯЗАТЕЛЬНО аккуратно перемешать содержимое лунок постукиванием по краю планшета в течение 30 секунд!			
8	Инкубация	Заклеить лунки планшета пленкой и поместить на инкубацию	30 минут при температуре (+18°C ...+25°C).	-
9	Промывка	1х промывочный раствор по 300 мкл в лунку (5 раз) с шейкированием 5 сек между заполнением и опорожнением лунок	+18°C ...+25°C	При использовании автоматического промывающего устройства тщательно следить за точностью наполнения и полнотой удаления жидкости из лунок микропланшета.
10	Внесение раствора конъюгата	Внести по 100 мкл КГ во все лунки планшета	+18°C ...+25°C	-
11	Инкубация	Заклеить лунки планшета пленкой и поместить на инкубацию	30 минут при температуре (+18°C ...+25°C).	-
12	Промывка	Аналогично п.8		
13	Внесение РХ	Внести по 100 мкл РХ во все лунки планшета	+18°C ...+25°C	-
14	Инкубация	Поместить планшет на инкубацию	15 минут при температуре (+18°C ...+25°C).	В защищенном от света месте
15	Внесение Стоп	Внести по 100 мкл Стоп во все лунки планшета	+18°C ...+25°C	-
16	Регистрация результатов	Измерить оптическую плотность (ОП): основной фильтр — 450 нм	Время между остановкой реакции и регистрацией результатов не должно превышать 30 мин.	-