



ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ «КУРСКАЯ БИОФАБРИКА - ФИРМА «БИОК»
305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5. Тел. (4712) 70-06-70, факс (4712) 70-54-26
**НАБОР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА ПТИЦ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ МЕТОДОМ**

СТО 00482909-142-2019
Для ветеринарного применения
Набор компонентов
Для исследования 184 проб

Серия № XX
Дата выпуска: XX.XXXX

Годен до: XX.XXXX

Перечень и количества компонентов:

- K1 – полистироловый 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа с иммобилизованным в лунках типоспецифическим антигеном вируса гриппа А – 2 планшета
- K2 – положительный контроль: сыворотка крови птиц, содержащая антитела к вирусу гриппа А – 1 флакон (0,2 см³)
- K3 – отрицательный контроль: сыворотка крови птиц, содержащая антитела к вирусу гриппа А – 1 флакон (0,2 см³)
- K4 – антицеллюлозный конъюгат (моноклональные антитела к IgY птиц, меченные пероксидазой) – 1 флакон (0,5 см³)
- K5 – концентрат (x 20) буферного раствора для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата – 1 флакон (10,0 см³)
- K6 – концентрат (x 20) буферного раствора для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата – 1 флакон (10,0 см³)
- K7 – раствор субстрата (Н₂O₂) – 1 флакон (22,0 см³)
- K8 – раствор хромогена (ТМБ) – 1 флакон (0,6 см³)
- K9 – стоп-раствор (1 М раствор фосфорной кислоты) – 1 флакон (20 см³)



Хранить в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С. Не допускается замораживание и нагрев выше плюс 25 °С в течение более 15 суток
Транспортировать всеми видами крытого транспорта в условиях, исключающих замораживание и нагрев выше плюс 25 °С в течение более 15 суток

Применять согласно инструкции
Отпускается без рецепта
Хранить в местах, недоступных для детей

Компонент № 1 упакован в индивидуальный маркированный пакет с влагопоглотителем. Остальные компоненты набора расфасованы в маркированные флаконы из непрозрачного полиэтилена соответствующей вместимости, с завинчивающимися пробками.

В каждую коробку вложена инструкция по применению набора.

Срок годности компонентов набора – 12 месяцев от даты изготовления.

Набор после вскрытия можно использовать в течение 30 суток при соблюдении условий хранения.

По истечении срока годности набор не должен применяться.

4. Препарат выпускают в виде набора компонентов и рассчитан на анализ 92 проб сывороток крови на каждом полистироловом планшете при одновременном использовании. Комплектация набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения исследований в разное время по мере поступления биологического материала, в этом случае количество анализируемых проб уменьшается на количество контрольных проб при проведении каждого анализа.

5. Хранить набор в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается транспортирование набора всеми видами крытого транспорта в упаковке производителя в условиях, исключающих замораживание, при температуре до 25 °С, в течение не более 15 суток.

Не допускается замораживание компонентов!

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

7. При нарушении целостности и укупорки флаконов, упаковки полистироловых планшетов и пакетов, изменении цвета компонентов, наличии посторонней примеси, при отсутствии этикеток, а также по истечении срока годности набор выбраковывают, иммуноспецифические компоненты инактивируют кипячением в течение 15 мин. Неиспользованные планшеты дезинфицируют в 3 % растворе хлорамина и утилизируют любым доступным, разрешенным методом. Утилизация неспецифических компонентов наборов не требует специальных мер безопасности.

8. Отпускается без рецепта.

II Биологические свойства

9. Набор относится к диагностическим препаратам для ветеринарного применения.

10. У зараженной или вакцинированной против вируса гриппа птицы вырабатываются специфические антитела, которые можно выявить в сыворотке крови иммуноферментным анализом (ИФА).

Принцип непрямого варианта иммуноферментного анализа заключается в выявлении комплекса, образованного антигеном, иммобилизованным с помощью моноклональных антител на поверхности лунок полистиролового планшета, и специфическими антителами, содержащимися в пробах сыворотки крови птиц. Специфический комплекс взаимодействует с антивидовым конъюгатом моноклональных антител к IgY птиц с пероксидазой и обнаруживается по изменению окраски раствора в результате химических превращений субстрата и хромогена. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе.

III Порядок применения

11. Набор предназначен для диагностики заболевания птиц (кур и индеек), вызванного вирусом гриппа типа А, и также может применяться при оценке поствакцинального гуморального иммунитета у вакцинированной птицы.

12. Запрещается применять для проведения других исследований.

13. Работы с набором должны проводиться в специально оборудованном помещении с соблюдением правил предосторожности и личной гигиены с использованием средств индивидуальной защиты. При соблюдении указанных правил использования набор не представляет опасности для здоровья человека. Меры личной профилактики при проведении диагностических исследований с использованием сывороток сводятся к соблюдению санитарно-эпидемиологических правил и техники безопасности при работе с биологическим материалом.

Все лица, участвующие в исследовании, должны быть одеты в спецодежду и спецобувь. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

14. В случае попадания компонентов набора или исследуемого материала на открытые участки тела или слизистые оболочки, их смывают проточной водопроводной водой.

15. Проведение исследования.

15.1. Материалом для исследования служат индивидуальные пробы сыворотки крови птиц.

Для исследования используют сыворотки крови птиц без признаков гемолиза и бактериальной контаминации, объёмом не менее 0,5 см³. Допускается хранение образцов сыворотки при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 72 ч или при температуре не выше минус 20 °С в течение 60 суток после их получения. Размораживать образцы сыворотки крови необходимо в водяной бане при температуре (37,0 ± 0,5) °С. Не рекомендуется многократное замораживание и оттаивание образцов.

15.2. Для проведения ИФА требуются одно- и восьмиканальные пипетки переменного объёма до 0,01; 0,20; 1,0; 5,0 и 10,0 см³ со сменными наконечниками, мерная лабораторная посуда, термостат с температурой нагрева (37,0 ± 0,5) °С, дистиллированная вода, бытовой холодильник, центрифуга, фильтровальная бумага, контейнер, система промывания планшетов, которая распределяет по 0,3 см³ раствора в лунку, спектрофотометр (ридер) для микропланшетов любой модели с фильтром на 450 нм для учёта результатов ИФА.

15.3. Перед началом работы набор выдерживают 25-30 мин при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С. Сразу после проведения анализа неиспользованные компоненты убирают в холодильник с температурой от 2 °С до 8 °С.

15.4. Перед началом работы составляют план проведения исследования.

15.5. Подготовка рабочих растворов.

15.5.1. Буферный рабочий раствор для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата. Компонент № 5 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают (например, для получения 50 см³ буферного раствора к 2,5 см³ концентрата добавляют 47,5 см³ дистиллированной воды). После разведения буфер приобретает светло-розовый цвет. Буферный рабочий раствор можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 5 суток.

15.5.2. Промывочный буферный рабочий раствор. Компонент № 6 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают (например, для получения 200 см³ промывочного буферного рабочего раствора к 10 см³ концентрата добавляют 190 см³ дистиллированной воды). После разведения промывочный буферный рабочий раствор можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 5 суток.

15.5.3. Рабочий раствор конъюгата. Компонент № 4 разбавляют буферным рабочим раствором для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата согласно концентрации, указанной на этикетке. Например, имея 40-кратный концентрат, в расчёте на один планшет, к 0,25 см³ компонента № 4 добавляют 10,0 см³ буферного рабочего раствора. Рабочий раствор конъюгата хранить нельзя.

15.5.4. Субстратная смесь. **Субстратную смесь изготавливают после завершения промывания лунок.** Для приготовления 10 см³ раствора субстратной смеси, необходимого для проведения реакции на одном планшете, смешивают 10,0 см³ раствора компонента № 7 и 0,25 см³ раствора компонента № 8. Подготовленный раствор субстратной смеси должен быть бесцветным и стабильным в течение 15 мин. Раствор субстратной смеси с изменённым цветом не используют.

15.5.5. Компонент набора № 9 (стоп-раствор) не требует предварительной подготовки.

15.6. Постановка реакции.

15.6.1. Из комплекта набора берут пакет с планшетом (компонент № 1), в лунках которого иммобилизован типоспецифический антиген вируса гриппа А. При необходимости отбирают требуемое количество стрипов, помещают в рамку-держатель и маркируют водостойким маркером из за возможного выпадения их из рамки во время проведения исследования. Неиспользованные стрипы помещают в пакет с влагопоглотителем и хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С. Неиспользуемые лунки цельного планшета можно сохранить для дальнейшего использования, если немедленно заклеить их герметичной водонепроницаемой плёнкой. Компонент № 1 (планшет) используют однократно.

15.6.2. Внесение испытуемых проб

Наслаивание сывороток. Сыворотки крови животных исследуют в разведении 1:26 в буферном рабочем растворе для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата. Все контрольные и испытуемые пробы сывороток разводят непосредственно в лунках планшета. **Необходимо тщательное перемешивание сывороток в лунках.**

В лунки стрипов полистиролового планшета в соответствии с подготовленным планом исследования вносят по $0,1 \text{ см}^3$ буферного рабочего раствора для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата, подготовленного согласно п. 15.5.1.

Внесение контролей:

– в лунки A1 и B1 полистиролового планшета вносят по $0,004 \text{ см}^3$ компонента № 2 (положительного контроля);

– в лунки C1 и D1 полистиролового планшета вносят по $0,004 \text{ см}^3$ компонента № 3 (отрицательного контроля).

Внесение контролей в лунки A1 – D1 не обязательно, они могут быть внесены в другие лунки планшета.

В остальные лунки полистиролового планшета вносят по $0,004 \text{ см}^3$ испытуемых проб сывороток крови.

Для внесения каждой пробы сыворотки крови используют новый наконечник.

Для повышения достоверности результатов рекомендуется внесение проб испытуемых сывороток в двух повторностях.

Внимание! Для контрольных образцов (компонентов №№ 2 – 3) постановка в двух повторностях обязательна.

15.6.3. Полистироловый планшет закрывают крышкой и инкубируют 1 ч (± 5 мин) при температуре $(37,0 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$.

15.6.4. Промывание лунок планшетов.

Содержимое лунок полистиролового планшета удаляют, используя автоматические или ручные промывающие системы, допускается вытряхивание. Все лунки планшета промывают 3 раза промывочным буферным рабочим раствором, подготовленным по п. 15.5.2 (по $0,3 \text{ см}^3$ в каждую лунку), затем раствор удаляют. Во время обработки большого количества планшетов (с целью синхронизации этапов) можно оставлять планшеты с промывочным буферным рабочим раствором до 20 мин.

После последнего промывания необходимо осторожно постучать планшетом по впитывающему материалу (фильтровальной бумаге) с целью полного удаления содержимого лунок.

15.6.5. Внесение конъюгата.

В каждую лунку планшета вносят по $0,1 \text{ см}^3$ рабочего раствора конъюгата, подготовленного согласно п. 15.5.3. Планшет закрывают крышкой (или плёнкой) и инкубируют 1 ч (± 5 мин) при температуре $(37,0 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$.

15.6.6. Промывание лунок планшета.

Четырёхкратно проводят процедуру промывания лунок планшета, описанную в п. 15.6.4.

15.6.7. Обнаружение (внесение субстратного раствора).

В каждую лунку полистиролового планшета вносят по $0,1 \text{ см}^3$ субстратного раствора, подготовленного согласно п. 15.5.4. Вносить раствор необходимо аккуратно, не касаясь лунок планшета.

Планшет закрывают крышкой и инкубируют при температуре от $18 \text{ }^\circ\text{C}$ до $24 \text{ }^\circ\text{C}$ в защищённом от прямых солнечных лучей месте от 1 мин до 10 мин до проявления ярко выраженного синего окрашивания в лунках с положительными контролями.

15.6.8. Остановка реакции.

В каждую используемую лунку полистиролового планшета вносят по $0,08 \text{ см}^3$ компонента № 9 (стоп-раствора). Не допускается контакт наконечника, содержащего стоп-раствор, с содержимым лунки, так как перенос окрашенного раствора из лунки в лунку или резервуар с раствором может исказить результаты. Тщательно вытирают наружную нижнюю поверхность планшета.

15.6.9. Учёт реакции.

Результаты анализа учитывают инструментальным способом. Сразу после остановки реакции измеряют оптическую плотность (ОП) продуктов реакции в каждой лунке при длине волны 450 нм , используя спектрофотометр (ридер) для микропланшетов с вертикальным лучом света. Перед проведением измерений устанавливают «0» фотометра по воздуху.

15.7. Оценка результатов реакции.

15.7.1. Оценивают величины оптической плотности, полученные в реакциях с контрольными компонентами №№ 2 – 3:

результаты считают достоверными, если контрольные показатели соответствуют критериям:

– среднее значение ОП, полученное в реакции с положительным контролем, (ОП⁺) должно быть не ниже 0,600 оптических единиц (опт. ед.) для компонента № 2;

– отношение между средними величинами, полученными в реакциях с положительным (ОП⁺) и отрицательным контролями равно или больше 3: ОП⁺ (компонента № 2) / ОП⁻ (компонента № 3) ≥ 3,0.

15.7.2. Если значения величин оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами №№ 2 – 3, не соответствуют указанным критериям, результаты считаются недостоверными и исследование проводят повторно.

15.7.3. Если отношения величин оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами №№ 2 – 3, соответствуют вышеуказанным критериям, то проводят оценку результатов реакций в лунках с испытуемыми пробами сыворотки.

15.7.4. Оценку результатов реакции испытуемых проб проводят по величине коэффициента (S/P), который рассчитывают по формуле:

$$S/P = \frac{ОП_{испытуемой\ пробы} - ОП^-}{ОП^+ - ОП^-}$$

Реакцию считают **положительной** для проб сыворотки крови, если значение S/P ≥ 0,3.

Реакцию считают **отрицательной** для проб сыворотки крови, если значение S/P < 0,3.

15.8 Интерпретация результатов.

Выявление положительной реакции в исследуемых сыворотках указывает на наличие специфических антител к вирусу гриппа.

Наличие специфических антител у неиммунизированной птицы указывает на циркуляцию полевого штамма вируса гриппа в исследуемом поголовье.

Наличие специфических антител у иммунизированной птицы свидетельствует об эффективности вакцинации птицы против вируса гриппа А.

16. Постановку иммуноферментного анализа проводят «in vitro» и исследование на организм птиц влияния не оказывает.

17. Особенности проявления реакции при соблюдении техники ее постановки не установлено.

18. Взаимодействия с другими лекарственными препаратами не может происходить, так как компоненты набора не контактируют с организмом птицы.

19. Несоблюдение методики постановки реакции может привести к ошибочным результатам.

20. Препарат не оказывает действия на продукцию убоя сельскохозяйственных животных и ее используют в соответствии с действующими правилами ветеринарно-санитарной экспертизы.

Наименование и адрес производственной площадки производителя лекарственного препарата для ветеринарного применения:

ФКП «Курская биофабрика», 305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5.

Наименование и адрес организации, уполномоченной на принятие претензий от потребителя:

ФКП «Курская биофабрика», 305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5.