



INSPEKCJA
WETERYNARYJNA
**GŁÓWNY LEKARZ
WETERYNARII**

Warszawa, dnia 18 czerwca 2025 r.

INSTRUKCJA

Głównego Lekarza Weterynarii

nr BP.0200.1.5.2025

dotycząca wykrywania przeciwciał dla wirusa rzekomego pomoru drobiu
metodą ELISA

Opracowano w:

Główny Inspektorat Weterynarii

Biuro do Spraw Laboratoriów

KRL ds. Grypy Ptaków i Rzekomego Pomoru Drobiu PIWet-PIB w Puławach

Niniejsza instrukcja została wydana na podstawie art. 13 ust.1 ustawy z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej (Dz. U. z 2024 r. poz. 12).

Niniejsza instrukcja została opracowana w Krajowym Laboratorium Referencyjnym ds. rzekomego pomoru drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach (autorzy: dr hab. Krzysztof Śmietanka, prof. instytutu dr Anna Pikuła).

Stosowanie niniejszej instrukcji, jako aktu prawnego wewnętrznego, nie może prowadzić do naruszenia przepisów powszechnie obowiązujących. Na przepisy niniejszej instrukcji nie należy powoływać się przy rozstrzyganiu o prawach i obowiązkach podmiotów prywatnych, gdyż nie jest ona dla nich wiążąca.

Spis treści

1. Wstęp	3
2. Cel instrukcji	3
3. Zakres stosowania.....	3
4. Zasady bezpiecznej pracy z materiałem biologicznym i odczynnikami	3
5. Wyposażenie i materiały pomocnicze	4
6. Odczynniki, wzorce lub materiały odniesienia	4
7. Przygotowanie próbek do badań	5
8. Wykonanie testu ELISA.....	5
9. Sposób odczytu wyników i ich interpretacja	6
10. Sposób wyrażania ostatecznego wyniku badania	6
11. Sposób postępowania w przypadku uzyskania wyników niezgodnych	6
12. Postanowienia końcowe	8

1. Wstęp

Rzekomy pomór drobiu (choroba Newcastle, ND) jest zakaźną i zaraźliwą chorobą drobiu, wywoływaną przez wirusy należące do rodzaju *Orthoavulavirus*, znane także jako wirus rzekomego pomoru drobiu (avian paramyxovirus serotyp 1, APMV-1 lub Newcastle disease virus, NDV). Wirusy te wykazują zróżnicowaną patogenność, jednak obowiązkowi zwalczania podlegają jedynie zakażenia wywołane przez szczepy o wysokiej zjadliwości. Jednym z podstawowych sposobów zapobiegania ND są szczepienia ochronne w stadach drobiu, z wykorzystaniem szczepionek żywych, inaktywowanych oraz nowej generacji (np. wektorowych). Szczepienia te indukują odpowiedź odpornościową, w tym powstawanie odporności humoralnej (związanej z przeciwciałami), która – obok odporności komórkowej – odgrywa kluczową rolę w ochronie przed śmiercią oraz łagodzeniu objawów klinicznych choroby. Poziom przeciwciał może być wykrywany i określany ilościowo m.in. za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA).

2. Cel instrukcji

Opis toku postępowania dla laboratoriów urzędowych, wyznaczonych przez Głównego Lekarza Weterynarii, mającego na celu wykrywanie przeciwciał dla wirusa rzekomego pomoru drobiu metodą ELISA.

3. Zakres stosowania

Test ELISA przeznaczony jest do wykrywania swoistych przeciwciał dla wirusa rzekomego pomoru drobiu w surowicach pochodzących od drobiu lub innych gatunków ptaków. Badania mogą być wykonywane wyłącznie z zastosowaniem testu dopuszczonego do stosowania dla danego gatunku ptaków.

4. Zasady bezpiecznej pracy z materiałem biologicznym i odczynnikami

Surowice należy traktować jako potencjalnie zakaźne. Niektóre odczynniki wchodzące w skład zestawu (surowice kontrolne oraz roztwór zatrzymujący reakcję barwną) mogą powodować podrażnienia w kontakcie ze skórą lub oczami. W trakcie wykonywania badania pracownicy powinni być ubrani w odzież ochronną, a po wykonanych badaniach wszystkie materiały jednorazowego użytku, środki ochrony osobistej, odpady, szkło laboratoryjne, narzędzia należy poddać unieszkodliwieniu przy pomocy metody termicznej lub chemicznej.

5. Wyposażenie i materiały pomocnicze:

- 1) chłodziarka;
- 2) zamrażarka;
- 3) czytnik absorbancji ELISA;
- 4) komputer z oprogramowaniem odczytu i interpretacji wyników ELISA;
- 5) płuczka mikropłytkowa;
- 6) pipety tłokowe wielokanałowe o zakresie 50-300 μ l;
- 7) pipety tłokowe jednokanałowe o zakresie 5-100 μ l oraz 1-5 ml;
- 8) wirówka stołowa;
- 9) mieszadła typu Vortex;
- 10) przykrywkę lub folię do mikropłytek;
- 11) końcówki do pipet o zakresie 5-300 μ l oraz 1-5 ml;
- 12) probówki wirówkowe;
- 13) plastikowe rynienki;
- 14) mikropłytki 96-dołkowe typu U;
- 15) statywy do probówek;
- 16) szklane butelki o różnej pojemności (zakręcane);
- 17) cylindry miarowe.

6. Odczynniki, wzorce lub materiały odniesienia

Standardowy zestaw ELISA do wykrywania przeciwciał dla wirusa ND obejmuje następujące elementy:

- 1) dodatnia surowica kontrolna;
- 2) ujemna surowica kontrolna;
- 3) mikropłytki – opłaszczane antygenem wirusa ND;
- 4) koniugat;
- 5) rozcieńczalnik prób;
- 6) substrat, np. TMB;
- 7) roztwór zatrzymujący reakcję barwną;
- 8) koncentrat płynu płuczającego;
- 9) inne, w zależności od producenta zestawu.

Odczynniki należy przechowywać w temperaturze 2-8°C, chyba że producent zestawu wskaże inaczej.

7. Przygotowanie próbek do badań

Standardowa liczba próbek do badań serologicznych wynosi 23 surowice z każdego stada. W przypadku gdy otrzymane próbki stanowią skrzepy krwi, należy je odwirować przy 750 – 1200 x g przez 5 min. w celu uzyskania surowicy stanowiącej właściwy materiał do badań. Surowice przechowywane są do 7 dni w chłodziarce. Jeśli przebadanie próbek nie jest możliwe w tym czasie należy je umieścić w zamrażarce. Przed przystąpieniem do badania próbka jest doprowadzona do temperatury pokojowej.

8. Wykonanie testu ELISA

Badania wykonywane są przy użyciu zestawu ELISA do serologicznej diagnostyki ND znajdującego się w wykazie wyrobów do diagnostyki *in vitro* stosowany w medycynie weterynaryjnej, który prowadzi Główny Lekarz Weterynarii. Badania należy wykonać zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta zestawu. Należy upewnić się, że producent danego zestawu dopuszcza jego stosowanie do badania surowic gatunku docelowego.

Ogólny schemat poszczególnych etapów badania testem ELISA jest następujący:

- 1) przygotowanie roboczego rozcieńczenia roztworu do płukania;
- 2) przygotowanie roboczego rozcieńczenia próbek badanych surowic;
- 3) wykonanie testu ELISA:
 - a) dodanie próbki rozcieńczonej surowicy do dołka mikropłytki; jeśli w próbce obecne są przeciwciała specyficzne dla danego antygenu, zwiążą się z antygenem na płytce,
 - b) płukanie celem usunięcia niezwiązanego materiału (niespecyficznych białek) za pomocą buforu do płukania,
 - c) dodanie przeciwciała sprzężonego z enzymem (konjugatu), rozpoznającego przeciwciała ptasie,
 - d) ponowne płukanie celem usunięcia niezwiązanego koniugatu,
 - e) dodanie substratu enzymatycznego (np. TMB), który w reakcji z enzymem daje reakcję barwną,
 - f) zatrzymanie reakcji kwasem (np. siarkowym),
 - g) odczyt wyników przy użyciu spektrofotometru (czytnika ELISA) przy określonej długości fali.

9. Sposób odczytu wyników i ich interpretacja

Sposób odczytu wyników i ich interpretację określa producent zestawu. Najczęściej interpretacja wyniku jest wykonywana automatycznie przez oprogramowanie oferowane przez producenta zestawu.

10. Sposób wyrażania ostatecznego wyniku badania

Ostateczny wynik wyrażany jest w jeden z następujących sposobów:

„Liczba surowic badanych:

Liczba surowic dodatnich:

W załączeniu szczegółowy wydruk raportu z programu komputerowego do odczytu wyników.”

lub

„Liczba surowic badanych: ...

Liczba surowic dodatnich:

% serododatnich:

Średnie miano geometryczne:.....

Współczynnik zmienności (CV):

Zakres mian dodatnich:

11. Sposób postępowania w przypadku uzyskania wyników niezgodnych

Najczęściej wyniki niezgodne mogą wynikać z następujących przyczyn:

Rodzaj problemu	Przyczyna	Postępowanie
Problemy z próbką	Hemolizowana lub lipemiczna surowica	Używać tylko świeżych, prawidłowo pobranych i przechowywanych próbek.
	Niewłaściwe przechowywanie próbek	Przechowywać próbki do 7 dni w temperaturze 5 (± 3)°C lub w temperaturze poniżej -20°C, unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania
	Niewłaściwe	Stosować rozcieńczenia

	rozcieńczenie surowicy	zgodnie z instrukcją testu.
Błędy techniczne	Niedokładne pipetowanie	Używać regularnie wzorcowanych lub sprawdzanych pipet automatycznych z kontrolą objętości
	Zanieczyszczone końcówki lub płytki	Używać jednorazowych, jałowych końcówek
	Niewystarczające lub nadmierne płukanie	Stosować zalecaną liczbę cykli płukania, zgodnie z zaleceniem producenta
	Niewłaściwy czas inkubacji	Przestrzegać czasów inkubacji podanych przez producenta testu
	Nieodpowiednia temperatura inkubacji	Utrzymywać stałą temperaturę inkubacji, zgodnie z zaleceniami producenta
Problemy z odczynnikami	Przeterminowane lub niewłaściwie przechowywane odczynniki	Sprawdzać daty ważności i odczynniki przechowywać zgodnie z zaleceniami producenta
	Nieprawidłowe rozcieńczenie koniugatu lub substratu	Przygotowywać rozcieńczenia na bieżąco i zgodnie z instrukcją producenta
	Substrat (np. TMB) wystawiony na światło	Przechowywać substrat TMB w ciemności i zgodnie z instrukcją producenta
	Zbyt długi czas przechowywania substratu	Nie stosować substratu po upływie terminu ważności – sprawdzać barwę
Błędy interpretacyjne	Pomyłki w rozmieszczeniu próbek na płytce	Oznaczać i planować rozmieszczenie próbek na płytce przed rozpoczęciem testu
	Odczyt przy niewłaściwej długości fali	Każdorazowo sprawdzać ustawienia czytnika ELISA, szczególnie przy stosowaniu zestawów różnych producentów.

W przypadku uzyskania wyników niezgodnych należy wprowadzić działania określone w wewnętrznych przepisach systemu zarządzania laboratorium.

12. Postanowienia końcowe

Instrukcja wchodzi w życie w dniu podpisania.

Zatwierdził
Główny Lekarz Weterynarii
Krzysztof Jażdżewski
/podpisano elektronicznie/