



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 АНТИГЕНОВ И СЫВОРОТК ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА ЛОШАДЕЙ

СТО 00482909-050-2008
Для ветеринарного применения
Лиофилизат



Серия № XX

Дата производства: XX.XXXX

Антиген вируса гриппа лошадей А/лошадь-1/Кэмбридж/63 инактивированный

Антиген вируса гриппа лошадей А/лошадь-2/Франция/98 инактивированный

Сыворотка крови пегуха, специфическая к вирусу гриппа лошадей А/лошадь-1/Кэмбридж/63

Сыворотка крови пегуха, специфическая к вирусу гриппа лошадей А/лошадь-2/Франция/98

Сыворотка крови пегуха, нормальная

| | |
|-------------------|-----------------------------|
| титр в РТГА 1:128 | 2 амп. по 1 см ³ |
| титр в РТГА 1:128 | 2 амп. по 1 см ³ |
| титр в РТГА 1:320 | 2 амп. по 1 см ³ |
| титр в РТГА 1:320 | 2 амп. по 1 см ³ |
| титр в РТГА 1:0 | 1 амп. по 1 см ³ |

Отпускается без рецепта.
Хранить в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С.
Допускается хранение при любой минусовой температуре в пределах срока годности.
Транспортируют всеми видами транспорта.
Хранить в местах недоступных для детей.

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «Всероссийский
государственной Центр качества и
стандартизации лекарственных средств
для животных и кормов», председатель ТК 454
А.Н. Панин

«30»



2014 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор
ФКП «Курская биофабрика»

В.М. Безгин



«10» марта

2014 г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА АНТИГЕНОВ И СЫВОРОТОК ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ ГРИППА ЛОШАДЕЙ
(Организация-производитель ФКП «Курская биофабрика»)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор антигенов и сывороток предназначен для диагностики гриппа лошадей путем идентификации выделенных штаммов вируса и исследования сывороток крови лошадей, больных и переболевших этой болезнью.

2. Диагностический набор содержит:

- 2 флакона (ампулы) с антигеном вируса гриппа лошадей А/лошадь-1/ (H7N7) инактивированным, сухим по 1,0 см³;

- 2 флакона (ампулы) с антигеном вируса гриппа лошадей А/лошадь-2/ (H3N8) инактивированным, сухим по 1,0 см³;

- 2 флакона (ампулы) с сывороткой крови петуха, специфической, к вирусу гриппа лошадей А/лошадь-1/, сухой по 1,0 см³;

- 2 флакона (ампулы) с сывороткой крови петуха, специфической, к вирусу гриппа лошадей А/лошадь-2/, сухой по 1,0 см³;

- 1 флакон (ампулу) с сывороткой крови петуха, нормальной, сухой 1,0 см³.

3. Специфические антигены представляют собой сухую аморфную массу беловато-серого цвета; специфические сыворотки - розовато-кремового цвета.

4. Срок годности набора 3 года с даты выпуска. Датой выпуска следует считать дату окончания процесса лиофильного высушивания.

В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

5. Набор хранят в сухом темном месте при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается хранение при любой минусовой температуре в пределах срока годности. По истечению срока годности препарат к применению не пригоден.

Препарат хранят в местах, недоступных для детей.

6. При нарушении целостности флакона (ампулы), изменении цвета препарата, консистенции, а также в случае не использования в течение 24 часов разведенный компонент набора инактивируют кипячением в течение 30 мин и утилизируют любым доступным разрешенным способом.

II. ПРИНЦИП РЕАКЦИИ

7. Принцип РТГА основан на способности специфических антител, содержащихся в сыворотке крови лошадей, тормозить гемагглютинирующую активность антигена (вируса) гриппа соответствующего серотипа, что визуально проявляется образованием структуры, которая наблюдается в отсутствие гемагглютинирующих агентов.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

8. Набор предназначен для:

- серологического мониторинга распространения вируса гриппа лошадей в популяции сельскохозяйственных животных;
- оценки эффективности иммунизации поголовья против данного заболевания;
- ретроспективной диагностики гриппа лошадей по приросту уровня специфических антител.

Для постановки РТГА используют:

- компоненты набора;
- исследуемый материал (сыворотка крови, носовые смывы);
- физиологический раствор (рН от 7,2 до 7,4);
- воду очищенную;
- 1 % суспензию эритроцитов петуха;
- посуду мерную лабораторную;
- пипетки градуированные объемом 1 см³;
- пипетки одно - и восьмиканальные автоматические фиксированного или переменного объема в пределах 0,025 – 0,4 см³ со сменными наконечниками;
- планшет плексигласовый;
- холодильник бытовой;
- баню водяную лабораторную;
- центрифугу со скоростью вращения ротора не менее 1500 об/мин;
- прибор для обработки сыворотки крови углекислым газом.

7. Антигены в ампулах (флаконах) разводят физиологическим раствором (рН 7,2 - 7,4) до первоначального объема, то есть добавляют к содержимому по 1,0 см³ физиологического раствора. Сухая масса должна раствориться при встряхивании полностью в течение 5 мин.

Сыворотки в ампулах (флаконах) разводят водой очищенной в соотношении 1:10. Сухая сыворотка должна растворяться при встряхивании в течение 5 мин. Разведенную сыворотку прогревают в водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин. Разведенные антигены и сыворотки хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов.

9. Приготовление 1 % суспензии эритроцитов петуха.

Для получения 1 % суспензии эритроцитов используют петухов старше 6 месяцев.

Взятие крови у петухов производят из подкрыльцовой вены. Набирают необходимое количество крови в стеклянную пробирку с 2 - 3 % раствором лимоннокислого натрия на физиологическом растворе (рН от 7,2 до 7,4) в соотношении 2:1. Полученную кровь трижды отмывают физиологическим раствором, осаждая

эритроциты на центрифуге в течение 10 мин при 1500 об/мин. Из осадка эритроцитов готовят 1 % суспензию, которую хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 4 сут.

10. Идентификация выделенного из патологического материала больных лошадей вируса в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

10.1 С целью выделения вируса используют носовые смывы от больных лошадей в первые 2-3 дня от начала заболевания. Для идентификации вируса в РТГА используют вирусосодержащий материал с титром гемагглютинации не ниже 1:8.

10.2 Постановка реакции гемагглютинации.

Реакция гемагглютинации является подготовительным этапом в постановке реакции торможения гемагглютинации.

В начале готовят двукратные разведения вирусосодержащего материала (или антигена из набора при исследовании сыворотки крови лошадей) от 1:2 до 1:1024. Для этого в ряд лунок вносят физиологический раствор в объеме 0,2 см³, или 0,025 см³ для микрометода. Затем в первую лунку вносят по 0,2 см³ (0,025 см³) вируса, трехкратно пипетируют и переносят 0,2 см³ (0,025 см³) смеси во вторую и т.д. до требуемого разведения. Из последней лунки 0,2 см³ (0,025 см³) смеси удаляют в дезинфицирующий раствор.

В каждую лунку добавляют по 0,2 см³ (0,025 см³) 1 % суспензии эритроцитов. Необходимо ставить контроль на спонтанную агглютинацию эритроцитов (к 0,2 см³ (0,025 см³) физиологического раствора добавляют 0,2 см³ (0,025 см³) 1 % суспензии эритроцитов).

Планшеты с лунками встряхивают и оставляют при температуре (19±2) °С, учет реакции проводят после полного оседания эритроцитов в контроле.

10.3 Учет реакции.

Положительная реакция гемагглютинации оценивается по форме осадка эритроцитов, которые оседают, образуя «зонтик». В случае отрицательной реакции, так же как и в контроле, эритроциты оседают, образуя на дне лунки «пуговку». Титром вируса считается то наибольшее разведение его, при котором наблюдается агглютинация эритроцитов.

10.4 Постановка реакции торможения гемагглютинации.

После того, как определен титр гемагглютинации вновь выделенного вируса (или антигена из набора), переходят к постановке реакции торможения гемагглютинации. Последняя, основана на способности специфических антител тормозить гемагглютинирующую активность вируса.

10.4.1 Для постановки реакции торможения гемагглютинации готовят рабочую дозу вновь выделенного вируса. С этой целью, выделенный вирус разводят физиологическим раствором во столько раз, сколько получают от деления титра вируса, полученного в РГА на 4. Например, рабочее разведение будет 128:4=32, то есть в 0,2 см³ (0,025 см³) разведенного 1:32 вируса будет содержаться 4 ГАЕ. Для его приготовления необходимо взять 31 см³ физиологического раствора и добавить 1 см³ исходного вируса. Перед постановкой основного опыта проверяют правильность выбора 4 ГАЕ. Для этого используют 5 лунок, в первую и вторую наливают 4 ГАЕ по 0,2 см³ (0,025 см³), то есть выбранное разведение вируса, после чего во вторую, третью, четвертую, пятую лунки наливают по 0,2 см³ (0,025 см³) физиологического раствора. После пипетирования из второй лунки переносят 0,2 см³ (0,025 см³) в третью, из третьей после смешивания – 0,2 см³ (0,025 см³) переносят в четвертую, а затем в пятую, из пятой

лунки удаляют $0,2 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) смеси в дезинфицирующий раствор. Таким образом, во 2-й лунке остается 2 ГАЕ, в 3-й - 1 ГАЕ, в 4-й - 0,5 ГАЕ, в 5-й - 0,25 ГАЕ. После этого в каждую лунку добавляют по $0,2 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) 1 % суспензии эритроцитов, планшеты легко встряхивают и оставляют на 30 мин. при температуре $(19 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$. При правильном выборе рабочей дозы (4 ГАЕ) в 1-й, 2-й, 3-й лунках должна быть полная агглютинация эритроцитов (зонтик); в 4-й лунке агглютинация может быть частичной или отсутствовать, а в 5-й лунке агглютинация должна отсутствовать.

10.4.2 В ряд лунок, начиная со второй, наливают по $0,2 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) физиологического раствора. Затем в первую и вторую лунки добавляют по $0,2 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) приготовленной (из набора) сыворотки в разведении 1:10. Во второй лунке пипетируют и переносят $0,2 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) смеси в третью и т.д., до полного разведения 1:2560, из последней лунки удаляют $0,2 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) в дезинфицирующий раствор. После этого во все лунки вносят по $0,2 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) рабочего разведения (4 ГАЕ) испытуемого вируса, планшеты с лункам встряхивают и оставляют при температуре $18-20 \text{ }^\circ\text{C}$. После тридцатиминутного контакта сыворотки с вирусом, в каждую лунку добавляют по $0,4 \text{ см}^3$ ($0,05 \text{ см}^3$) 1% суспензии эритроцитов.

Для точности учета реакции торможения гемагглютинации ставят контроль:

- контроль сыворотки для исключения присутствия изоагглютининов к эритроцитам: ($0,2 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) сыворотки в разведении 1:10, $0,2 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) физиологического раствора и $0,4 \text{ см}^3$ ($0,05 \text{ см}^3$) 1 % суспензии эритроцитов);
- контроль избранной дозы вируса: (0,2 рабочей дозы вируса (4 ГАЕ) и $0,2 \text{ см}^3$ 1 % суспензии эритроцитов);
- контроль стандартных диагностикумов: (антигенов $0,2 + 0,2 \text{ см}^3$ ($0,025 + 0,025 \text{ см}^3$) гомологичных сывороток + $0,4 \text{ см}^3$ ($0,1 \text{ см}^3$) 1 % суспензии эритроцитов);
- контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию: ($0,2 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) физиологический раствор и $0,2 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) 1% суспензии эритроцитов).

10.4.3. Учет реакции.

Титром сыворотки считается последнее разведение ее, давшее полную задержку гемагглютинации вируса. Идентификацию возбудителя считают завершенной, если диагностическая сыворотка из набора тормозит гемагглютинирующую активность выделенного штамма вируса в том же титре, как антиген из набора.

10.5 Установление специфических антител (антигемагглютининов) в сыворотке крови больных животных к вирусу гриппа лошадей.

10.5.1 Парные сыворотки крови лошадей отбирают после проявления первых клинических признаков заболевания у животных и через 2 – 4 недели.

11. Получение и подготовка сывороток.

Кровь от лошадей берут в области верхней трети шеи (яремной вены) в пробирки, увлажненные физиологическим раствором. Полученную кровь выдерживают 2 - 3 ч при температуре $(19 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$, осторожно по стенке пробирки обводят стерильной стеклянной палочкой или другим инструментом и переносят в холодильник с температурой $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Через 12 - 24 ч сыворотку отсасывают в стерильную пробирку. Сыворотки отправляют на исследование или хранят в замороженном виде. Избегать повторного замораживания и оттаивания сывороток.

Перед использованием сыворотки разводят как указано в п. 8 и прогревают в водяной бане при температуре $56 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 мин., для удаления термолабильных ингибиторов. Для удаления термостабильных ингибиторов

прогретую сыворотку обрабатывают углекислым газом в течение 2 - 3 мин., затем центрифугируют при 1500 об/мин, в течение 5 мин., надосадочную часть сыворотки собирают для постановки РТГА (для удаления термостабильных ингибиторов допускается обработка сывороток каолином или периодатом калия).

12. Постановка реакции торможения гемагглютинации.

12.1 Постановка реакции описана в п. 10.4.

В реакции используют антигены 1 и 2 серотипа, подготовленные согласно п. 10.4.1.

13. Обработка результатов.

Титром сыворотки считается последнее разведение ее, давшее полную задержку гемагглютинации с одним заведомо известным антигеном.

Штаммовая принадлежность определена, если испытуемая сыворотка тормозит гемагглютинирующую активность диагностического антигена в пределах целого или $1/2$ - $1/8$ его титра с гомологичной диагностической сывороткой, при отсутствии реакции с другим антигеном или же в реакции не выше 1:20. Ретроспективно диагноз на грипп может быть поставлен при исследовании парных сывороток крови лошадей при четырехкратном увеличении в них титра.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ.

14. Безвреден для людей.

15. Не требует применения мер безопасности.

16. Лица, проводящие диагностику, должны соблюдать правила личной гигиены.

17. При работе с набором следует избегать порезов рук стеклом при нарушении целостности стеклянных ампул (флаконов), в которые расфасованы компоненты набора. При порезах рук стеклом первую помощь оказывают согласно общепринятым методикам.

18. Набор следует хранить в местах недоступных для детей.

19. Запрещается курение, прием пищи и воды в помещении, где проводят работу с набором.

20. Организация - производитель – ФКП «Курская биофабрика» (305004, Россия, г. Курск, ул. Разина, 5).

Инструкция по применению набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа лошадей разработана специалистами ФКП «Курская биофабрика» (305004, Россия, г. Курск, ул. Разина, 5).