

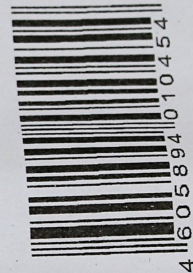
352212, Россия, Краснодарский край, Новокубанский район,
пос. Прогресс, ул. Мечникова, 11
тел. (86195)4-10-28 факс (86195)2-11-15



ФКП «Армавирская биофабрика»

**НАБОР АНТИГЕНОВ И СЫВОРОТОК ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ ГРИППА ПТИЦ В РЕАКЦИИ
ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РТГА)**

«Для ветеринарного применения»
СТО 00482849-0097-2020



В коробке:

1. Антиген (гемагглютинин) H_1-N_{13} – 13 флаконов
Во флаконе 2 см^3
2. Специфическая сыворотка к H_1-N_{13} – 13 флаконов
Во флаконе 1 см^3
3. Нормальная сыворотка не содержащая антител
к вирусу гриппа птиц - 1 флакон Во флаконе 1 см^3

Серия № 6

Дата выпуска 06.2023

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФКП «Армавирская
биофабрика»

Е.В. Сууский
2021г.



Инструкция

по ветеринарному применению набора антигенов и сывороток для диагностики
гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации (РТГА)

(Организация-разработчик: ФКП «Армавирская биофабрика», адрес: 352212, Краснодарский край,
Новокубанский район, пос. Прогресс, ул. Мечникова, дом 11.)

I. Общие сведения

1. Торговое наименование: Набор антигенов и сывороток для диагностики
гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Международное непатентованное наименование: Набор антигенов и
сывороток для диагностики гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации
(РТГА).

2. Лекарственная форма: лиофилизат для диагностических целей. Сыворотки
получают из крови клинических здоровых баранов, гипериммунизированных
культурой гриппа птиц.

Антигены и сыворотки выпускают в наборе для диагностики гриппа птиц в
реакции торможения гемагглютинации (РТГА). В его состав входят:

- инактивированные референтные штаммы вируса гриппа птиц с подтипами
гемагглютинина H_1-N_{13} ;
- моноспецифические гипериммунные сыворотки к 13 серологическим вариантам
вируса гриппа птиц (H_1-N_{13})
- нормальная сыворотка не содержащая антител к вирусу гриппа птиц.

В зависимости от эпизоотической ситуации по гриппу птиц набор антигенов и
сывороток для диагностики гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации
(РТГА) может быть укомплектован одним или несколькими антигенами вируса
гриппа птиц с соответствующими специфическими и нормальной сыворотками.

3. По внешнему виду сыворотка в сухом виде представляет собой
однородную пористую массу светло-розового до светло-коричневого цвета, а
нативная сыворотка - это прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость
светло-желтого или красноватого цвета, может быть незначительный белковый осадок,
легко разбивающийся при встряхивании, в равномерную взвесь. Антигены в сухом
виде представляют собой однородную пористую массу желто-белого цвета, а в
нативном состоянии от светло-коричневого до темно-коричневого цвета жидкость
может быть незначительный белковый осадок, легко разбивающийся при
встряхивании, в равномерную взвесь.

Срок годности 2 года с даты выпуска при соблюдении условий хранения и транспортирования. После первого вскрытия флакона антигена и сыворотки необходимо использовать в течение 12 часов. По истечении срока годности антигены и сыворотки к применению не пригодны.

4. Сыворотки расфасовывают по 1,0 см³, антигены расфасовывают по 2,0 см³ в стерильные стеклянные флаконы соответствующей вместимости. Флаконы герметично укупоривают резиновыми пробками и обкатывают алюминиевыми колпачками соответствующего цвета.

Набор №1 состоит из 27 флаконов: 13 флаконов антигенов (Н₁-Н₁₃), 13 флаконов сывороток (Н₁-Н₁₃), 1 флакон - сыворотки нормальной.

Набор №2 состоит из 15 флаконов: 5 флаконов антигенов (Н₅), 5 флаконов антигенов (Н₇), 2 флакона сыворотки (Н₅), 2 флакона сыворотки (Н₇) 1 флакон - сыворотки нормальной. Внутри каждой пачки вкладывают инструкцию по применению.

Флаконы с антигенами и сыворотками упаковывают в картонные коробки (пачки), снабженные инструкцией по применению и таблицей проверки специфичности антигенов и сывороток. Коробки (пачки) упаковывают в ящики из гофрированного картона.

5. Наборы хранят и транспортируют в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 15 °С. Допускается транспортирование наборов в упаковке организации - производителя или термоконтейнерах многократного использования при температуре не выше 25° С, при этом срок транспортирования не должен превышать 5 суток.

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

7. Флаконы с антигенами и сыворотками без маркировки, с нарушением целостности и/или герметичности укупорки, с измененным цветом и/или консистенцией содержимого, наличием посторонних примесей, с истекшим сроком годности, подвергшиеся замораживанию, а также антигены и сыворотку, не использованные в течение 12 часов после первого вскрытия флакона, бракуют и обеззараживают путем кипячения в течение 30 минут. Аналогичным образом обрабатывают флаконы из - под антигенов и сывороток.

Утилизация обеззараженных антигенов и сывороток не требует соблюдения специальных мер предосторожности.

8. Наборы отпускают без рецепта ветеринарного врача.

II. Биологические свойства

9. Диагностический препарат. Лечебными свойствами не обладает. Принцип РТГА основан на способности специфических антител, содержащихся в сыворотке крови, тормозить гемагглютинирующую активность вируса гриппа птиц соответствующего антигенного подтипа, что визуально определяется по оседанию или склеиванию эритроцитов.

Титр сыворотки в РТГА: от 1:16 до 1:2048

Титр антигена в РГА: от 1:32 до 1:2048

III. Порядок применения.

10. Набор антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) предназначен для: обнаружения антител в сыворотке крови сельскохозяйственных, синантропных, диких и экзотических птиц к серологическим вариантам вируса гриппа H_1-N_{13} в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), определение напряженности поствакцинального иммунитета в РТГ, ретроспективной диагностики гриппа у всех видов птиц по приросту уровня специфических антител, серологической идентификации выделенных штаммов вируса гриппа птиц.

11. При работе с наборами следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными средствами ветеринарного назначения.

12. Специальных средств защиты при работе с набором не требуется. При попадании сыворотки или антигенов на кожу и/или слизистые оболочки их промывают большим количеством водопроводной воды. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

При случайном попадании испытуемой культуры на кожу, слизистые оболочки человека, пораженный участок необходимо срочно обработать любым антисептиком (5%-ным раствором йода или 70%-ным раствором спирта ректификата) и обратиться в медицинское учреждение.

13. Исследования сыворотки крови птиц на наличие антител к вирусу гриппа в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

13.1 Подготовка к постановке реакции.

13.1.1. Готовят один из следующих физиологических растворов - 0,1 М фосфатно-буферный раствор (ФБР) рН 7,0-7,2, который в дальнейшем используют на всех этапах постановки реакции.

13.1.2. Для получения сыворотки у птиц берут кровь из подкрыльцовой вены или путем скарификации гребня, в объеме 1,0-2,0 см³ в чистые пробирки, предварительно увлажненные физиологическим раствором.

Образовавшийся сгусток отделяют от стенок пробирки тонким металлическим стержнем или пастеровской пипеткой и выдерживают 12-18 ч при комнатной температуре (18-20)⁰ С. Отстоявшуюся сыворотку сливают в чистые пробирки и исследуют в РТГА. При необходимости хранения сывороток более 3-х суток до начала исследований их консервируют азидом натрия в конечной концентрации 0,1 или мертиолятом (тиомерсалом) в соотношении 1:20000 и помещают в холодильник при 2-8⁰ С или замораживают.

13.1.3. Перед постановкой РТГА сыворотку крови разводят дистиллированной водой в соотношении 1:8. Для удаления термолабильных и термостабильных ингибиторов, разведенную сыворотку прогревают в водяной бане при температуре 58-60⁰ С в течение 30 минут и обрабатывают углекислым газом в течение 2-3 минут. Затем образцы центрифугируют при 1500 об/мин (800g) в течение 15-20 мин, декантируют и используют для постановки РТГА.

13.1.4. Приготовление суспензии куриных эритроцитов.

Для получения взвеси эритроцитов используют СПФ-цыплят или коммерческих птиц, не имеющих антител к вирусу гриппа.

Кровь берут из подкрыльцовой вены во флаконы с 2-3% раствором лимоннокислого натрия, смешанным с физиологическим раствором в соотношении 1:2 (допускается использование раствора Альсевера в соотношении 1:1). Эритроциты трижды отмывают указанным раствором путем центрифугирования в течение 5-10 мин при 1500 об/мин (800 g).

Из осадка эритроцитов готовят 1% суспензию на физиологическом растворе, которую хранят в холодильнике (2-8)⁰ С и используют до появления признаков гемолиза эритроцитов.

13.2. Постановка реакции торможения гемагглютинации (РТГА)

РТГА проводят в три этапа:

- подготовка рабочей зоны антигена;
- определение титра антител в пробах крови в РТГА.

13.2.1. Постановка реакции гемагглютинации (РГА).

Антигены во флаконах восстанавливают до первоначального объема. Сухая масса должна раствориться полностью в течение 5 мин и представлять собой гомогенную взвесь без осадка. Для постановки РГА используют пластиковые, одноразовые микропанели с U-ным дном и микропипетки с фиксируемым или варьируемым объемом не менее 0,025-0,05 см³. Допускается повторное использование микропанелей, предварительно тщательно отмытых и обработанных 70% ректифицированным спиртом.

Вначале готовят двукратные разведения антигенов. Для этого во все лунки микропанели вносят физиологический раствор в выбранном рабочем объеме (0,025 или 0,5 см³). В первую лунку добавляют подготовленный антиген вируса гриппа птиц в рабочем объеме, трехкратно пипетируют и рабочий объем во вторую лунку и т.д. Из последней лунки после трехкратного пипетирования рабочий объем испытуемого материала удаляют в 2%-ый раствор едкого натрия или другой подобный дезинфектант. Затем во все лунки микропанели с раститрованным антигеном добавляют рабочий объем физиологического раствора и вносят в таком же объеме 1% суспензию куриных эритроцитов. Микропанели аккуратно встряхивают и оставляют при комнатной температуре (18-22)⁰ С на 40 мин. Если комнатная температура выше указанной, микропанели оставляют при 4⁰ С на 60 мин.

Для контроля эритроцитов на отсутствие спонтанной агглютинации и определение времени учета в две лунки микропанели с двойным рабочим объемом физиологического раствора (0,05 см³ или 0,1 см³) добавляют по 0,025 см³ или 0,05 см³ 1% суспензии куриных эритроцитов.

Реакцию учитывают при полном оседании эритроцитов в виде «пуговки» в контрольных лунках.

РГА оценивают положительно при оседании эритроцитов в виде «зонтика», отрицательно - в виде «пуговки» при отсутствии агглютинации во всех контрольных лунках.

За титр антигена принимают его наибольшее разведение, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов в виде «зонтика», что соответствует 1 гемагглютинирующей единице (1 ГАЕ).

Подготовка рабочей дозы антигена.

Для постановки РТГА готовят рабочую дозу антигена - 4 ГАЕ, исходя из его титра, установленного в РГА (п.13.2.1).

Для этого антиген разводят физиологическим раствором во столько раз, сколько получают от деления его титра на 4.

Например: титр антигена, определенный в РГА равен 1:256. Для приготовления рабочего разведения (4 ГАЕ) необходимо взять 63,0 см³ физиологического раствора и 1 см³ исходного антигена (256:4=64).

Рабочую дозу антигена готовят непосредственно перед постановкой реакции с обязательным контролем 4 ГАЕ. Для этого в 4 лунки разливают физиологический раствор в объеме, выбранном для постановки реакции. В первую добавляют равный объем подготовленной рабочей дозы антигена и готовят двукратные разведения согласно п.13.2.1.

При правильном выборе рабочей дозы в первой и второй лунках, содержащих 2 и 1 ГАЕ, должна быть полная агглютинация («зонтик»), в третьей лунке, содержащей 1/2 ГАЕ, - частичная, в четвертой - отсутствие агглютинации («пуговка»).

Корректирование рабочей дозы антигена (увеличение или уменьшение) проводят добавлением антигена или физиологического раствора с обязательным повторным контролем 4 ГАЕ.

Допускается использование 8 ГАЕ антигена.

13.2.2. Определение титра антител в пробах сыворотки крови.

Для постановки РТГА во все лунки микропанели вносят физиологический раствор в рабочем объеме (0,025 см³ или 0,05 см³). После этого в первую лунку добавляют равный объем испытуемой сыворотки, подготовленной по п.13.1.3., трижды пипетируют и готовят ряд последовательных двукратных разведений с 1:16 до 1:512. Последнюю лунку каждого ряда микропанели используют для контроля сыворотки на отсутствие изоагглютинации.

При необходимости определения антител одновременно к нескольким подтипам гемагглютинина вируса, из каждой испытуемой сыворотки готовят ряд последовательных двукратных разведений (титруют) в соответствующих повторностях.

Затем, во все лунки вносят рабочее разведение антигена в рабочем объеме по 0,025 см³ или 0,05 см³, осторожно встряхивают и оставляют на контакт в течение 30 мин при комнатной температуре (18-22)⁰С или 60 мин - при температуре 2-8⁰С.

После истечения времени контакта, в каждую лунку добавляют рабочий объем 1% суспензии куриных эритроцитов.

Одновременно ставят контроли:

- на отсутствие изоагглютинации сывороток - в лунку вносят рабочий объем физиологического раствора, добавляют равный объем испытуемой сыворотки и 1% суспензии куриных эритроцитов. Агглютинация эритроцитов должна отсутствовать.

13.2.3. Микропанели аккуратно встряхивают и оставляют при комнатной температуре (18-22)⁰С на 40 мин. Если комнатная температура выше указанной, микропанели оставляют при 2-8⁰С на 60 мин.

В случае проявления феномена изоагглютинации к 0,05 см³ сыворотки добавляют 0,025 см³ осадка отмытых эритроцитов, тщательно встряхивают и выдерживают не менее 30 мин при комнатной температуре. Затем эритроциты осаждают центрифугированием при 1500 об/мин (800g) в течение 3-5 мин. Сыворотку декантируют и используют для повторной постановки реакции.

При наличии спонтанной агглютинации эритроцитов их необходимо заменить.

Учет реакции проводят визуально после полного оседания эритроцитов в контрольных лунках в виде «пуговки». Титром сыворотки считают наибольшее ее разведение, в котором полностью отсутствует агглютинация эритроцитов антигеном вируса гриппа.

Результат исследования считается положительным, если титр сыворотки составляет $4,0 \log_2 (1:16)$ и выше. При использовании в реакции 8 ГАЕ результат исследования считается положительным, если титр сыворотки $3,0 \log_2 (1:8)$ и выше.

14. Ретроспективная диагностика гриппа птиц.

Ретроспективную диагностику гриппа птиц проводят по приросту уровня антител к вирусу гриппа птиц (H1-N13) в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Парные сыворотки отбирают в количестве не менее 25 проб из обследуемой партии птиц: первый раз - при возникновении подозрения на заболевание птиц гриппом или проявлении первых клинических признаков заболевания, второй раз – через 14 суток.

14.1. Получение, подготовку сывороток для исследования и постановку РТГА по 13.1.1.-13.1.4; 13.2.1.-13.2.3.

14.2. Обработка результатов.

Диагноз на грипп птиц считается установленным при обнаружении 4-х и более кратного прироста уровня специфических антител в парных пробах сыворотки.

15. Серологическая идентификация выделенных штаммов вируса гриппа птиц.

15.1. Для идентификации используют гемагглютинирующие изоляты вирусов с титром в РГА не ниже 1:8.

15.2. Определение гемагглютинирующего титра вирусного изолята (экстраэмбриональная жидкость куриных эмбрионов) в РГА и расчет рабочей дозы проводят по п.13.1.1.-13.1.4.;13.2.1-13.2.3.

15.3. Специфические и нормальную сыворотки из набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц восстанавливают до первоначального объема дистиллированной водой. Сухая масса должна раствориться полностью в течение 5 мин. и представлять собой гомогенную взвесь без осадка.

15.4. Подготовку сывороток из набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц для исследования и постановку РТГА проводят по п.13.1.1-13.1.4; 13.2.1-13.2.3.

15.5. Интерпретация результатов.

При обнаружении положительной РТГА с одной из специфических сывороток ее дополнительно исследуют с 4 ГАЕ гомологичного антигена.

Штаммовая принадлежность выделенного вируса считается установленной, если известная сыворотка из диагностического набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц положительно реагирует с ним в титре не ниже одного разведения, установленного с гомологичным антигеном.

При этом положительная реакция идентифицируемого вируса с другими специфическими и нормальной сыворотками, входящими в состав диагностического набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц, должна отсутствовать.

16. При получении отрицательных результатов РТГА со всеми входящими в диагностический набор сыворотками выделенный вирусный изолят направляют на дополнительную идентификацию.

17. Наименование, адрес организации – производителя: ФКП «Армавирская биофабрика», 352212, Краснодарский край, Новокубанский район, пос. Прогресс, ул. Мечникова, дом 11.

Инструкция по применению набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) разработана: ФКП «Армавирская биофабрика», 352212, Краснодарский край, Новокубанский район, пос. Прогресс, ул. Мечникова, дом 11.

Инструкция утверждена директором ФКП «Армавирская биофабрика».

