



**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 ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ
НЬЮКАСЛСКОЙ
БОЛЕЗНИ ПТИЦ В РТГА**
СТО 00482909-146-2021
Для ветеринарного применения

500 доз

Антиген инактивированный вируса ньюкаслской болезни (НВ),
лиофилизированный – 2 флакона по 4,0 см³

Титр антигена в РГА 1:256

Сыворотка крови кур к вирусу НВ гипериммунная (положительный
контроль), лиофилизированная – 1 флакон по 0,5 см³

Титр сыворотки в РТГА 1:256

Сыворотка крови кур нормальная (отрицательный контроль) –
1 флакон по 0,5 см³

Титр сыворотки в РТГА 1:0

20-кратный концентрат солей в виде раствора – 5 флаконов по 20 см³

Соль натрия лимоннокислого, порошок – 1 флакон по 3,0 г

96-луночные U-образные (круглодонные) планшеты для
иммунологических реакций – 4 шт

Отпускается без рецепта.

Применять согласно инструкции по применению.

Набор хранят при температуре от 2 °С до 8 °С.
Допускается хранение сухих компонентов набора при минусовой
температуре в пределах срока годности.

Допускается транспортирование при
температуре 25 °С, не более 15 суток.

Хранить в местах недоступных для детей.



СЕРИЯ 198 100
ДЛЯ ВЕТЕРИНАРИИ
LOT: 00482909-146-2021



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ФКП «Курская биофабрика»

В.М. Безгин

07

2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по ветеринарному применению набора для выявления антител
к вирусу ньюкаслской болезни птиц в РТГА

(Организация-разработчик: Федеральное казенное предприятие «Курская биофабрика – фирма «БИОК»
(ФКП «Курская биофабрика»), 305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Торговое наименование - Набор для выявления антител к вирусу ньюкаслской болезни птиц в РТГА.

2. Набор для выявления антител к вирусу ньюкаслской болезни в РТГА (реакции торможения гемагглютинации), (далее набор) состоит из следующих иммуноспецифических и неспецифических компонентов:

Иммуноспецифические компоненты:

- антиген инактивированный вируса ньюкаслской болезни (НБ), лиофилизированный, объем 4,0 см³ - 2 флакона;

- сыворотка крови кур к вирусу НБ гипериммунная (положительный контроль), лиофилизированная, объем 0,5 см³ или нативная, объем 0,5 см³ - 1 флакон;

- сыворотка крови кур нормальная (отрицательный контроль), не содержащая антител к вирусу НБ, лиофилизированная, объем 0,5 см³ или нативная, объем 0,5 см³ - 1 флакон.

Неспецифические компоненты:

- набор солей для приготовления забуференного Натрия хлорида 0,9 % раствора: натрий хлористый, натрий фосфорнокислый двузамещенный и калий фосфорнокислый однозамещенный - порошок, масса 22,5 г - 1 флакон (или 20-кратный концентрат солей в виде раствора – 5 флаконов по 20 см³);

- соль натрия лимоннокислого – порошок, масса 3,0 г – 1 флакон.

- 96-луночные U-образные (круглодонные) планшеты для иммунологических реакций – 4 штуки.

3. По внешнему виду антиген вируса НБ представляет собой сухую аморфную массу белого или светло-желтого цвета.

Положительная сыворотка крови кур в лиофилизированном виде представляет собой сухую аморфную массу светло-желтого или красноватого цвета, в нативном виде - прозрачную жидкость желтого или красноватого цвета.

Нормальная сыворотка крови кур в лиофилизированном виде представляет собой сухую аморфную массу белого или светло-желтого цвета, в нативном виде - прозрачную жидкость светло-желтого цвета.

Набор солей для приготовления забуференного Натрия хлорида 0,9 % раствора представляет собой порошок белого цвета (20-кратный концентрат солей – прозрачную жидкость), соль натрия лимоннокислого представляет собой порошок белого цвета.

Иммуноспецифические компоненты набора в лиофилизированном виде полностью растворяются в забуференном растворе Натрия хлорида 0,9 % раствора в течение 5 мин.

Флаконы после первого вскрытия можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более пяти суток, а в замороженном состоянии можно хранить не более 30 суток.

Срок годности набора - 2 года с даты изготовления при соблюдении условий хранения

и транспортирования.

По истечению срока годности набор не применять.

4. Специфические компоненты набора расфасованы в стеклянные флаконы, укупоренные алюминиевыми колпачками соответствующей вместимости. Неспецифические компоненты набора расфасованы в стеклянные флаконы, укупоренные алюминиевыми колпачками или в полиэтиленовые пакеты, соответствующей вместимости.

Флаконы с компонентами набора упаковывают в картонные коробки с наличием гнезд или перегородок, обеспечивающих целостность компонентов. В каждую коробку вкладывают планшеты для постановки реакции и инструкцию по применению набора.

Набор рассчитан на проведение 500 исследований проб сыворотки крови.

Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения исследований по мере поступления биологического материала.

5. Набор хранят в упакованном виде (в коробках или транспортной таре) при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается хранение сухих компонентов набора при минусовой температуре в пределах срока годности. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С, не более 15 суток.

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

7. Компоненты набора во флаконах без маркировки, с нарушением целостности и/или герметичности укупорки, с измененным внешним видом, с истекшим сроком годности, не использованные антиген и сыворотки, хранившиеся при температуре от 2 °С до 8 °С более пяти суток, а в замороженном состоянии более 30 суток бракуют, инактивируют кипячением в течение 30 минут и утилизируют любым доступным, разрешенным методом.

8. Утилизация инактивированных компонентов набора не требует специальных мер предосторожности.

II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

9. Набор предназначен для определения уровня антител в сыворотке крови птиц к вирусу ньюкаслской болезни птиц и представляет собой диагностический препарат.

10. Принцип РТГА основан на специфическом взаимодействии антител, содержащихся в сыворотке крови птиц, с антигеном вируса НБ, что приводит к потере его агглютинирующих свойств и визуально проявляется оседанием или склеиванием эритроцитов.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

11. Набор предназначен для:

- серологического мониторинга распространения ньюкаслской болезни в популяциях сельскохозяйственных птиц;
- оценки эффективности вакцинации птиц против ньюкаслской болезни;
- ретроспективной диагностики ньюкаслской болезни птиц по приросту уровня специфических антител.

12. Противопоказания для применения:

- запрещается применять компоненты набора без маркировки, с нарушением целостности и/или герметичности флаконов, с измененным внешним видом, при наличии посторонних примесей, с истекшим сроком годности;
- запрещается использовать разведенные антигены и сыворотки, хранившиеся при температуре от 2 °С до 8 °С более пяти суток, а в замороженном состоянии более 30 суток;
- запрещается применять инструменты, используемые для постановки реакции, для проведения других исследований.

13. Работы с компонентами набора должны проводиться с соблюдением правил предосторожности и личной гигиены с использованием средств индивидуальной защиты. При соблюдении указанных правил использование компонентов набора не представляет опасности для здоровья человека. Меры личной профилактики при проведении диагностических исследований с использованием компонентов набора сводятся к соблюдению санитарно-эпидемиологических правил и техники безопасности при работе с лекарственными средствами

ветеринарного назначения. Все лица, участвующие в исследовании, должны быть одеты в спецодежду и спецобувь. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи. В случае попадания содержимого флакона на открытые участки тела или слизистые оболочки, их смывают проточной водопроводной водой.

14. Постановку РТГА проводят «in vitro» и реакция на организм животных влияния не оказывает.

15. Способы применения набора.

Для постановки РТГА используют:

- компоненты набора;
- исследуемый материал;
- 1 % суспензию эритроцитов петуха;
- вода дистиллированная;
- посуду мерную лабораторную;
- пипетки градуированные объемом 1 - 2 см³;
- пипетки одно - и восьмиканальные автоматические фиксированного или переменного объема в пределах 0,025 – 0,4 см³ со сменными наконечниками;
- планшет плексигласовый с U образным дном;
- холодильник бытовой;
- баню водяную лабораторную;
- центрифугу со скоростью вращения ротора не менее 1500 об/мин.

15.1 Приготовление рабочих растворов.

15.1.1 Раствор № 1. Для приготовления раствора № 1 содержимое флакона с набором солей для приготовления забуференного Натрия хлорида 0,9 % раствора растворить в 2000 см³ дистиллированной воды (20 см³ (1 флакон) 20-кратного концентрата солей добавить к 380 см³ дистиллированной воды и перемешать). Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного месяца.

15.1.2 Раствор № 2. Для приготовления раствора № 2 содержимое флакона с солью натрия лимоннокислого растворить в 100 см³ раствора № 1. Раствор рекомендуется хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного месяца.

15.2 Подготовка иммуноспецифических компонентов набора.

15.2.1 Содержимое флакона с антигеном растворить в 4,0 см³ раствора № 1. Подготовленный антиген рекомендуется хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного месяца.

15.2.2 Содержимое флакона с положительной сывороткой растворить в 0,5 см³ раствора № 1. Подготовленную положительную сыворотку рекомендуется хранить при температуре минус 10 °С и ниже не более одного месяца. В течение срока хранения размораживание допускается 2-3 раза.

Сыворотка в нативном виде готова к применению. Вскрытый флакон рекомендуется хранить при температуре минус 10 °С и ниже не более одного месяца. В течение срока хранения размораживание допускается 2-3 раза.

15.3 Содержимое флакона с нормальной сывороткой растворить в 0,5 см³ раствора № 1. Подготовленную сыворотку рекомендуется хранить при температуре минус 10 °С и ниже не более одного месяца. В течение срока хранения размораживание допускается 2-3 раза.

Сыворотка в нативном виде готова к применению. Вскрытый флакон рекомендуется хранить при температуре минус 10 °С и ниже не более одного месяца. В течение срока хранения размораживание допускается 2-3 раза.

15.4 Для получения эритроцитов используют цыплят, кур или петухов-доноров, не имеющих антител к вирусу НБ.

Кровь берут из подкрыльцовой вены во флаконы с раствором № 2 в соотношении 1:2, трижды отмывают раствором № 1 путем центрифугирования при 1500 об/мин 10 мин. Из осадка эритроцитов на растворе № 1 готовят 1 % суспензию. Для этого в 99 см³ раствора № 1 добавляют 1 см³ концентрата эритроцитов (осадок). Хранить суспензию можно при температуре от 2 °С до 8 °С до появления признаков гемолиза эритроцитов.

15.5 Получение сыворотки крови.

Кровь берут из подкрыльцовой вены или путем скарификации гребня в объеме 1,0-2,0 см³ в чистые пробирки, предварительно увлажненные раствором № 1. Образовавшийся сгусток отделяют от стенок тонким металлическим стержнем или пастеровской пипеткой и выдерживают при температуре 20-25 °С в течение 12-18 ч или при температуре 37 °С (в термостате) в течение 60 мин, а затем 8-10 ч при температуре от 2 °С до 8 °С. Отстоявшуюся сыворотку сливают в чистые пробирки и исследуют в РТГА. При необходимости хранения сывороток более 3-х суток до начала исследований, их замораживают при температуре не ниже минус 20 °С.

Для удаления термолабильных ингибиторов сыворотку крови прогревают в водяной бане при 56-58 °С в течение 30 мин.

15.6 РТГА проводят в три этапа.

- определение гемагглютинирующего титра антигена в реакции гемагглютинации (РГА);

- подготовка рабочей дозы антигена;

- выявление специфических антител в пробах сыворотки крови.

15.7 Постановка реакции гемагглютинации.

Для постановки РГА готовят двукратные разведения антигена от 1:2 до 1:4096. С этой целью во все лунки планшета пипеткой внести раствор № 1 (0,05 см³ или 0,025 см³). В первую лунку горизонтального ряда добавить равный объем подготовленного антигена вируса НВ, трехкратно пипетировать и перенести по 0,05 см³ или 0,025 см³ во вторую лунку и т.д. Из последней лунки удалить по 0,05 см³ или 0,025 см³ испытуемого материала в 2 %-ый раствор едкого натрия или другой подобный дезинфектант.

После разведения антигена во все лунки внести 1 %-ную суспензию эритроцитов в объеме, равном исходному объему раствора № 1. Планшет аккуратно встряхнуть и оставить при температуре 20-25 °С, учет реакции проводят после полного оседания эритроцитов в контроле.

Для контроля эритроцитов на отсутствие спонтанной агглютинации и определения времени учета реакции в две-три лунки планшета с двойным объемом раствора № 1 (0,1 см³ или 0,05 см³) добавить по 0,05 см³ или 0,025 см³ 1 % суспензии эритроцитов. Учет реакции проводят после оседания эритроцитов в виде «пуговицы» в контрольных лунках.

РГА оценивают положительно при оседании эритроцитов в виде хорошо выраженного «зонтика», отрицательно - в виде «пуговицы» при отсутствии спонтанной агглютинации в контроле.

За титр антигена принимают его наибольшее разведение, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов в виде «зонтика», что соответствует 1 гемагглютинирующей единице (1 ГАЕ). Титр антигена должен соответствовать значению, указанному на этикетке флакона с антигеном ± одно разведение.

Примечание: Получение нечетких результатов может быть связано с изменившимся рН раствора № 1 или индивидуальными особенностями птиц-доноров эритроцитов.

15.8 Подготовка рабочей дозы антигена.

Для постановки РТГА готовят рабочую дозу антигена (4 ГАЕ) исходя из его титра, установленного в РГА (п. 15.7).

Для этого исходный антиген разводят раствором № 1 во столько раз, сколько получают от деления его титра на 4. Например: титр антигена в РГА 1:256. Следовательно, для приготовления рабочего разведения антигена необходимо взять 63,0 см³ раствора № 1 и 1,0 см³ исходного антигена (256:4=64). Объем рабочей дозы антигена определяют, исходя из количества подлежащих исследованию сывороток.

Для постановки РТГА микрометодом на исследование 1 сыворотки в 12 разведениях требуется 0,6 см³ или 0,3 см³ 4 ГАЕ антигена (в зависимости от первоначального объема забуференного физиологического раствора).

15.9 Рабочую дозу антигена готовят непосредственно в день постановки реакции с обязательным контролем 4 ГАЕ.

Для этого в 4 лунки разлить раствор № 1 в объеме, выбранном для постановки реакции. В первую добавить равный объем рабочей дозы антигена и титровать согласно п.15.7. Для

определения времени учета реакции в две-три лунки планшета с двойным объемом раствора № 1 ($0,1 \text{ см}^3$ или $0,05 \text{ см}^3$) добавить по $0,05 \text{ см}^3$ или $0,025 \text{ см}^3$ 1 % суспензии эритроцитов.

15.10 Учет реакции.

Учет реакции проводят после оседания эритроцитов в контроле. При правильном определении рабочей дозы в первой и второй лунках должна быть полная агглютинация («зонтик»), в третьей лунке, содержащей $1/2$ ГАЕ - частичная, в четвертой - отсутствие агглютинации («пуговка»). Полная агглютинация в третьей лунке означает, что доза антигена завышена, а отсутствие агглютинации в первой или во второй лунках свидетельствует о недостаточном его количестве.

Корректирование рабочей дозы (увеличение или уменьшение) проводят путем добавления антигена или раствора № 1 с обязательным повторным контролем 4 ГАЕ.

15.11 Выявление специфических антител в пробах сыворотки крови.

Во все лунки планшета внести раствор № 1 в объеме $0,05 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$). Затем в первую лунку горизонтального ряда добавить равный объем испытуемой сыворотки, подготовленной по п.15.5, трижды пипетировать и приготовить ряд последовательных двукратных разведений (с 1:2 до 1:4096).

После этого, во все лунки внести рабочее разведение антигена в объеме $0,05 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$), осторожно встряхнуть и после 30 мин контакта при температуре 20-25 °С в каждую лунку добавить $0,1 \text{ см}^3$ ($0,05 \text{ см}^3$) 1 % суспензии эритроцитов. Планшет аккуратно встряхнуть и оставить при температуре 20-25 °С, учет реакции проводят после полного оседания эритроцитов в контроле.

Одновременно ставят контроли реакции:

- на отсутствие изоагглютинации сывороток - в одну лунку планшета внести $0,05 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) раствора № 1, добавить равный объем испытуемой сыворотки и 1 %-ной суспензии эритроцитов в двойном объеме. Агглютинация эритроцитов должна отсутствовать. В случае проявления изоагглютинации к $0,05 \text{ см}^3$ сыворотки добавить $0,025 \text{ см}^3$ осадка отмытых эритроцитов, тщательно встряхнуть и выдержать не менее 30 мин при температуре 20-25 °С. Затем эритроциты осадить центрифугированием при 1500 об/мин в течение 3-5 мин. Сыворотку декантировать и использовать для повторной постановки реакции.

- на спонтанную агглютинацию эритроцитов - к двойному объему раствора № 1 добавить $0,05 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) 1 %-ной суспензии эритроцитов. Спонтанная агглютинация эритроцитов должна отсутствовать.

- контроль активности положительной и отрицательной сывороток крови - в лунки одного ряда планшета (для каждой сыворотки использовать отдельный ряд) внести по $0,025 \text{ см}^3$ или $0,05 \text{ см}^3$ раствора № 1. Затем в первые лунки добавить равные объемы специфической и нормальной сывороток, трижды пипетировать и приготовить последовательные двукратные разведения с 1:2 - 1:4096. После этого в лунки внести рабочую дозу антигена в выбранном объеме для постановки реакции, осторожно встряхнуть и оставить для контакта в течение 30 мин при температуре 20-25 °С или 60 мин при температуре 2-8 °С, после чего в каждую лунку добавить по $0,025 \text{ см}^3$ или $0,05 \text{ см}^3$ 1 % суспензии эритроцитов. Контрольная положительная сыворотка должна тормозить гемагглютинирующую активность 4 ГАЕ антигена в титре, указанном на этикетке флакона с положительной сывороткой \pm одно разведение. Нормальная сыворотка должна тормозить гемагглютинирующую активность 4 ГАЕ антигена в титре, меньшем, чем 1:4.

Учет результатов реакции.

Учет результатов 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 НБ.

Исследуемая сыворотка оценивается положительно, если она содержит специфические к вирусу НБ антитела в титре 1:8-1:16 ($3,0-4,0 \log_2$) и выше.

15.12 Интерпретация полученных результатов.

По результатам РТГА определяют эффективность иммунизации в партии привитых цыплят путем деления суммарного количества проб с титром антител 1:8 - 1:16 и выше (после применения живых вакцин) или 1:32 и выше (после применения инактивированных вакцин) на

общее число исследованных сывороток и выражают в процентах.

Птицу считают иммунной к вирусу ньюкаслской болезни при эффективности иммунизации 80 и более процентов после применения живых вирусвакцин и 80-90 и более процентов после использования инактивированных препаратов.

Обнаружение в РТГА высокого титра антител (1:2048 и выше у птиц, привитых живыми вакцинами, и 1:4096 и выше у птиц, привитых инактивированными вакцинами) свидетельствует о возможной циркуляции в стаде полевого вируса ньюкаслской болезни. В таких случаях через 21-30 суток проводят повторное исследование проб сывороток крови, полученных от этих же птиц.

Снижение или стабилизация уровня антител и (или) уменьшение количества птиц с высоким уровнем антител при повторных исследованиях проб сыворотки крови свидетельствует об отсутствии циркуляции в хозяйстве эпизоотического вируса и является следствием поствакцинальных реакций.

Наращение титров и (или) увеличение количества птиц с высоким уровнем антител при наличии клинических и патологоанатомических признаков НБ не является основанием для объявления в хозяйстве неблагополучия по данному заболеванию, но предусматривает установление за птицей тщательного наблюдения, проведения систематических серологических и вирусологических исследований.

Наращение титров и (или) увеличение количества птиц с высоким уровнем антител при наличии клинико-патологоанатомических признаков заболевания служит основанием для проведения детального эпизоотологического обследования хозяйства и установления окончательного диагноза по данному заболеванию.

Обнаружение антител к вирусу ньюкаслской болезни у птиц, не привитых против НБ, без клинических и патологоанатомических признаков заболевания свидетельствует о циркуляции полевых лентогенных штаммов вируса ньюкаслской болезни и не является основанием для объявления хозяйства неблагополучным по НБ. За птицей таких хозяйств устанавливают постоянное наблюдение.

16. Следует избегать нарушений схемы проведения реакции торможения гемагглютинации и учета реакции, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.

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

18. Применение набора согласно инструкции по применению исключает возможность взаимодействия с другими лекарственными препаратами и кормами.

19. Несоответствие объемов смешиваемых компонентов может привести к ошибочным результатам реакции.

20. Препарат не оказывает влияния на организм животного, так как не контактирует с ним.

21. 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 препарата для ветеринарного применения:

Федеральное казенное предприятие «Курская биофабрика – фирма «БИОК» (ФКП «Курская биофабрика»), 305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5.

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

Федеральное казенное предприятие «Курская биофабрика – фирма «БИОК» (ФКП «Курская биофабрика»), 305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5.