

Утверждаю
Заместитель Руководителя
Россельхознадзора

« 30 » 11/2006 г.



Е.А. Непоклонов

2006 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

(Организация-производитель:
ОАО «Покровский завод биопрепаратов»)

I. Общие сведения

1. 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 H1 – H15 в реакции торможения гемагглютинации (РТГА);
- определения напряженности поствакцинального иммунитета в РТГА;
- ретроспективной диагностики гриппа у всех видов птиц по приросту уровня специфических антител;
- серологической идентификации выделенных штаммов вируса гриппа птиц.

2. В состав набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) входят:

- инаktivированные референтные штаммы вируса гриппа птиц с подтипами гемагглютинина H1-H15;
- моноспецифические гипериммунные сыворотки к 15 серологическим вариантам вируса гриппа птиц (H1-H15);
- 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 антигены и сыворотки представляют собой сухую однородную пористую массу желто-белого (антигены) или беловато-серого (сыворотки) цвета.

4. Антигены и сыворотки расфасовывают по 1 см³ в стеклянные ампулы, или по 2 см³ во флаконы соответствующей вместимости. Ампулы запаивают, а

флаконы герметично укупоривают резиновыми пробками и обкатывают алюминиевыми колпачками.

5. Ампулы (флаконы) с компонентами набора маркируют с указанием:

- **Антиген** - краткого наименования организации-производителя, названия компонента, наименования штамма вируса гриппа птиц, подтипа гемагглютинина и нейраминидазы, объема (см^3) в ампуле (флаконе), титра в РГА, номера серии и номера контроля, даты изготовления (число, месяц, год), срока годности (число, месяц, год);

- **Специфическая сыворотка** - краткого наименования организации-производителя, названия компонента, видовой принадлежности сыворотки, наименования штамма вируса гриппа, подтипов гемагглютинина и нейраминидазы, к которому она получена, титра в РТГА, объема (см^3) в ампуле (флаконе), номера серии и контроля, даты изготовления;

- **Нормальная сыворотка** - краткого наименования организации-производителя, названия компонента, видовой принадлежности сыворотки, объема (см^3) в ампуле (флаконе), номера серии и контроля, даты изготовления.

6. Ампулы (флаконы) с компонентами набора упаковывают в картонные или полистироловые коробки, обеспечивающие их неподвижность и целостность.

7. На коробки с наборами наклеивают этикетку, на которой указывают: наименование организации-производителя, товарный знак, адрес и телефон, наименование набора, перечень компонентов и количество флаконов (ампул) каждого компонента в коробке, количество каждого компонента во флаконе (ампуле), см^3 , номер серии набора, номер контроля, дату комплектации (мес., год), срок годности (мес., год), условия хранения, обозначение СТО, штрих-код, знак соответствия.

К каждой коробке с набором антигенов и сывороток прилагают инструкцию по применению.

8. Набор антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) хранят в сухом, темном месте при температуре не выше 8°C в течение 24 месяцев с даты комплектации.

9. Ампулы, флаконы без этикеток, с нарушением целостности или герметичности укупорки, с измененным цветом или консистенцией, содержащие посторонние примеси, с истекшим сроком годности, а также не использованные разведенные антигены, и сыворотки, хранившиеся при температуре от 2 до 8°C в течение 3-х суток, а в замороженном состоянии 15 суток, выбраковывают и обезвреживают кипячением в течение 20 минут.

II. Принцип метода

10. 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.

III. Порядок применения

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

11.1. Подготовка к постановке реакции

11.1.1. Готовят один из следующих физиологических растворов – 0,1 М фосфатно-буферный раствор (ФБР) pH 7,0 - 7,2 или 0,9% раствор NaCl pH 7,0 - 7,2, который в дальнейшем используют на всех этапах постановки реакции.

11.1.2. Для получения сыворотки у птиц берут кровь из подкрыльцовой вены или путём 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° 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 1:20 000 и помещают в холодильник при 2-8° С или замораживают.

11.1.3. Перед постановкой РТГА сыворотку крови разводят дистиллированной водой в соотношении 1:8. Для удаления термолabileных и термостабильных ингибиторов, разведенную сыворотку прогревают в водяной бане при температуре 58-60°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.

Допускается удаление термостабильных ингибиторов с помощью фильтрата нехолерного вибриона, периодата калия, сухого льда или др., рекомендуемых для этих целей реагентов.

11.1.4. 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 Альсвера в соотношении 1:1). Эритроциты трижды отмывают указанным раствором путем центрифугирования в течение 5-10 мин при 1500 об/мин (800g).

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

11.2. Постановка реакции торможения гемагглютинации (РТГА)

РТГА проводят в три этапа:

- определение гемагглютинирующего титра вируса в реакции гемагглютинации

(РГА);

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

11.2.1. Постановка РГА.

Антигены в ампулах (флаконах) восстанавливают до первоначального объема. Сухая масса должна раствориться полностью в течение 5 мин и представлять собой однородную взвесь без осадка.

Для постановки РГА используют пластиковые, одноразовые микропанели с U-образным дном и микропипетки с фиксируемым или варьируемым объемом не менее $0,025-0,05\text{см}^3$.

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 ($0,025\text{см}^3$ или $0,05\text{см}^3$). В первую лунку добавляют подготовленный антиген вируса гриппа птиц в рабочем объеме, трехкратно пипетируют и переносят 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 ($18-22^\circ\text{C}$) на 40 мин. Если комнатная температура выше указанной, микропанели оставляют при 4°C на 60 мин.

Для контроля эритроцитов на отсутствие спонтанной агглютинации и определения времени учета в две лунки микропанели с двойным рабочим объемом физиологического раствора ($0,05\text{см}^3$ или $0,1\text{см}^3$) добавляют по $0,025\text{см}^3$ или $0,05\text{см}^3$ 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).

11.2.2. Подготовка рабочей дозы антигена.

Для постановки РТГА готовят рабочую дозу антигена - 4 ГАЕ, исходя из его титра, установленного в РГА (п.11.2.1.). 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 $63,0 \text{ см}^3$ физиологического раствора и 1 см^3 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. 11.2.1.

При правильном выборе рабочей дозы в первой и второй лунках, содержащих 2 и 1 ГАЕ, должна быть полная агглютинация («зонтик»), в третьей лунке, содержащей $\frac{1}{2}$ 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.

11.2.3. Определение титра антител в пробах сыворотки крови.

Для постановки РТГА во все лунки микропанели вносят физиологический раствор в рабочем объеме ($0,025 \text{ см}^3$ или $0,05 \text{ см}^3$). После этого в первую лунку добавляют равный объем испытуемой сыворотки, подготовленной по п. 11.1.3., 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 гемагглютиниана 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 $0,025 \text{ см}^3$ или $0,05 \text{ см}^3$, осторожно встряхивают и оставляют на контакт в течение 30 мин при комнатной температуре ($18-22^\circ\text{C}$) или 60 мин - при температуре $2-8^\circ\text{C}$.

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;

- на спонтанную агглютинацию эритроцитов - к двойному рабочему объему физиологического раствора добавляют рабочий объем 1% суспензии куриных эритроцитов. Агглютинация должна отсутствовать.

Микропанели аккуратно встряхивают и оставляют при комнатной температуре ($18-22^\circ\text{C}$) на 40 мин. Если комнатная температура выше указанной

микропаннели оставляют при 2-8°C 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 минут 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 log₂ (1:16) и выше. При использовании в реакции 8 ГАЕ результат исследования считается положительным, если титр сыворотки 3,0 log₂ (1:8) и выше.

12. Ретроспективная диагностика гриппа птиц.

Ретроспективную диагностику гриппа птиц проводят по приросту уровня антител к вирусу гриппа птиц (H1-N15) 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.

12.1. Получение, подготовку сывороток для исследования и постановку РТГА по п.11.1.1-11.1.4; 11.2.1-11.2.3.

12.2. Обработка результатов.

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

13. Серологическая идентификация выделенных штаммов вируса гриппа птиц.

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

13.2. Определение гемагглютинирующего титра вирусного изолята (экстраэмбриональная жидкость куриных эмбрионов) в РГА и расчет рабочей дозы проводят по п. 11.1.1-11.1.4; 11.2.1-11.2.3.

13.3. 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.

13.4. Подготовку сывороток из набора антигенов и сывороток для диагностики

гриппа птиц для исследования и постановку РТГА проводят по п. 11.1.1-11.1.4; 11.2.1-11.2.3.

13.5. 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.

14. При получении отрицательных результатов РТГА со всеми входящими в диагностический набор сыворотками выделенный вирусный изолят направляют на дополнительную идентификацию в ЦВЛ или научно-исследовательское учреждение страны вирусологического профиля.

IV. Меры личной профилактики

15. Работа с набором не требует специальных мер предосторожности. При подготовке ингредиентов и их использовании следует строго соблюдать меры личной гигиены и техники безопасности.

16. Хранить набор следует в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана ОАО «Покровский завод биопрепаратов»

Организация-производитель: 601125, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский ОАО «Покровский завод биопрепаратов» Тел/факс 8 (492) 43-71 110.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ «ВГНКИ»

Регистрационный номер: ПВР-1-2.6/01685