МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
ГУ «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ»

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора диагностического для типирования вирусов гриппа
и определения антител к вирусу гриппа в реакции торможения гемагглютинации

Диагностический набор предназначен для типирования вирусов гриппа, определения антител к вирусу гриппа при исследовании парных сывороток и оценки иммуногенности вакцин против вируса гриппа в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Принцип работы набора основан на специфическом связывании антител исследуемых сывороток крови (либо иммунных асцитических жидкостей – далее ИАЖ) с поверхностными рецепторами вирусной частицы – молекулами гемагглютинина (ГА). Комплекс «антиген-антитело» препятствует взаимодействию рецепторов ГА и эритроцитов, что сопровождается торможением гемагглютинации.

Состав набора

Диагностический набор выпускается в виде 8-ми комплектов:

Наименование компонента	Количество флаконов							
	Комплект 1	Комплект 2	Комплект 3	Комплект 4	Комплект 5	Комплект 6	Комплект 7	Комплект 8
№1 антиген гриппозный типа А(H1N1)	1	1	-	-	-	-	-	-
№2 антиген гриппозный типа А (H1N1)pdm09	1	1	1	1	4	-	-	-
№3 антиген гриппозный типа А (H3N2)	1	1	1	1	-	4	-	-
№4 антиген гриппозный типа А(H5N1)	1	1	-	-	-	-	-	-
№5 антиген гриппозный типа В (линия В/Виктория/2/87)	1	1	1	1	-	-	4	-
№6 антиген гриппозный типа В (линия В/Ямагата/16/88)	1	1	1	1	-	-	-	4
№7 типоспецифическая ИАЖ к вирусу гриппа типа А (H1N1)	-	1	-	-	-	-	-	-
№8 типоспецифическая ИАЖ к вирусу гриппа типа А (H1N1)pdm09	-	1	-	1	-	-	-	-
№9 типоспецифическая ИАЖ к вирусу гриппа типа А (H3N2)	-	1	-	1	-	-	-	-
№10 типоспецифическая ИАЖ к вирусу гриппа типа А (H5N1)	-	1	-	-	-	-	-	-
№11 типоспецифическая ИАЖ к вирусу гриппа типа В (линия В/Виктория/2/87)	-	1	-	1	-	-	-	-
№12 типоспецифическая ИАЖ к вирусу гриппа типа В (линия В/Ямагата/16/88)	-	1	-	1	-	-	-	-
№13 неиммунная асцитическая жидкость	-	1	-	1	-	-	-	-
Инструкция по применению	1	1	1	1	1	1	1	1

Способ проведения исследования

Подготовка проб для исследования.

Для серологической диагностики гриппа необходимо использовать парные сыворотки, полученные стандартными лабораторными методами в соответствии с действующими техническими нормативно-правовыми актами. Первая сыворотка должна быть получена в острую стадию заболевания, вторая – через 2-3 недели после первой. Для диагностики следует использовать прозрачные, светлые, без признаков бактериального проростка и гемолиза сыворотки.

До исследования сыворотки с момента забора необходимо хранить при температуре от 4 до 8 °С не более 3-х суток или в замороженном состоянии при температуре минус 20 ±2ºС –12 месяцев. Перед исследованием сыворотки следует развести физиологическим раствором (ФР) в соотношении 1:10 (к 0,1 мл нативной сыворотки добавить 0,9 мл ФР) и

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

прогреть на водяной бане при 56°С в течение 30 минут для удаления термолабильных ингибиторов.

Для типирования выделенных изолятов вируса гриппа используют вируссодержащую культуральную жидкость (при выделении вируса гриппа на культуре клеток) или аллантоисную жидкость (при выделении вируса гриппа в развивающемся курином эмбрионе).

Ход исследования.

1. Постановка РТГА при исследовании парных сывороток

1.1 Растворение антигена: вскрыть флаконы и внести объем физиологического раствора, указанного на флаконе (1 мл).

1.2 Определение титра гемагглютининов контрольных антигенов

Промаркировать планшет. Во все лунки планшета, включая контроль эритроцитов, добавить 50 мкл ФР. В верхние лунки внести по 50 мкл антигена в соответствии с маркировкой. Сделать двукратные серийные разведения каждого антигена от 1:2 до 1:256., перенося по 50 мкл в последующие лунки, сбрасывая 50 мкл конечного разведения антигена. Добавить во все лунки 50 мкл эритроцитов 0(1) группы крови (0,75% суспензия), включая контроль. Инкубировать планшет при комнатной температуре до полного оседания эритроцитов в контрольных лунках.

Титр антигенов необходимо определять перед каждой постановкой РТГА.

Учет результата

Результаты учитываются через 30-40 мин после полного оседания эритроцитов в контроле. За титр антигена, следует принимать наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (3 или 4 креста), что соответствует 1 гемагглютинирующей единице (далее - ГАЕ).

1.3Подготовка рабочего разведения антигена для РТГА

Приготовить рабочее разведение антигена, в 50 мкл которого содержится 8 ГАЕ. Для его вычисления следует установленную величину титра антигена разделить на 8. Полученная от деления цифра указывает, во сколько раз нужно развести антиген, чтобы в 50 мкл его содержалось 8 ГАЕ. Например, 1 мл антигена требуется для тестирования 5 сывороток, каждая из которых титруется до 8 лунок при добавлении в лунку 25 мкл антигена (5 сывороток х 8 лунок х 25 мкл = 1 мл). Необходимо приготовить дополнительно 1 мл рабочего разведения для «повторного» титрования. Например, вирус с титром 64 надо развести в 8 раз, чтобы получить 8 ГАЕ/50 мкл (64:8=8). Для этого необходимо смешать 1 часть вируса с 7 частями ФР для получения желаемого объема рабочего разведения (0,2 мл антигена + 1,4 мл ФР).

Провести «повторное» титрование для проверки правильности приготовления антигена. При правильном выборе разведения четко выраженная агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в верхних трех лунках. Наличие агглютинации в четвертой лунке означает, что доза антигена завышена, а отсутствие агглютинации в первой-третьей лунках свидетельствует о недостаточном его количестве.

Корректирование рабочей дозы (увеличение или уменьшение) следует проводить путём добавления антигена или физиологического раствора с обязательным повторным контролем 8 ГАЕ.

Хранить рабочее разведение антигена при 2 - 8°С и использовать в течение 12 часов.

1.4 Определение антител к вирусу гриппа в РТГА при исследовании парных сывороток

Промаркировать панель. Одну панель рекомендуется использовать для определения титра парных сывороток к одному антигену. Парные сыворотки от каждого пациента, обработанные, как указано выше, должны быть исследованы в одном эксперименте.

В верхнюю лунку соответственно маркировке внести 50 мкл исследуемой разведенной 1:10 сыворотки. В каждую лунку планшета, за исключением верхней, внести по 25 мкл ФР. Приготовить серию двукратных разведений сывороток от 1:10 до 1:1280, перенося по 25 мкл в последующие лунки. Во все лунки внести 25 мкл рабочего разведения антигена. Аккуратно встряхнуть планшет и инкубировать при комнатной температуре в течении 10 мин. После этого в каждую лунку планшета добавить 50 мкл 0,75% суспензии эритроцитов 0(1) группы крови.

Одновременно необходимо поставить отрицательный контроль реакции на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов (в контрольные лунки той же планшеты внести 50 мкл ФР и 50 мкл 0,75 % суспензии эритроцитов I (0) группы крови).

Учет результата

Учет результата проводят через 30-40 мин после полного оседания эритроцитов в контрольных лунках. Титром антител сыворотки крови считают максимальное их разведение, при котором наблюдается полное ингибирование агглютинации эритроцитов при взаимодействии вируса со специфическими антителами. Диагностическим считают 4-х кратный прирост титров антител в постинфекционной сыворотке по сравнению с сывороткой острой фазы заболевания.

2.Постановка РТГА для идентификации изолятов вируса гриппа

***2.1 Растворение антигена и ИАЖ*:** вскрыть флаконы и внести объем ФР, указанного на флаконе (1 и 0,5 мл).

2.2 Обработка ИАЖ: перед исследованием растворенные ИАЖ разводят ФР в соотношении 1:10 и прогревают на водяной бане при 56°С в течение 30 минут.

2.3. Определение титра гемагглютининов контрольных антигенов и изолятов как описано выше (п.1.2).

2.4. Подготовка рабочего разведения контрольных антигенов и изолятов: приготовить разведения контрольных антигенов и исследуемых изолятов, содержащие 8 ГАЕ/50 мкл (см п.1.3).

2.3. Типирование изолятов: проводят по принципу исследования парных сывороток, используя в данном случае вместо сывороток ИАЖ по методике, описанной выше (см. п. 1.4.). Одновременно проводят постановку РТГА антигенов и ИАЖ из набора для определения гомологичных титров.

Учет результата

Титр ИАЖ в реакции с гомологичным антигеном должен быть не более или равен 1:320, с гетерологичными антигенами не более или равен 1:20. Титр неиммунной асцитической жидкости не более или равен. 1:10.

Задержка гемагглютинации указывает на соответствие типа антигена и взятой ИАЖ. Изолят относят к определенному типу или субтипу вируса гриппа, если он реагирует в РТГА с одной из ИАЖ с титрами, равными или превышающими 4-х кратную разницу по сравнению со всеми другими ИАЖ. Положительная реакция с негативной асцитической жидкостью должна отсутствовать. Например, изолят Х прореагировал в РТГА со следующими титрами с ИАЖ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

к вирусам гриппа типа А(H1N1) – **1:20**, А(H1N1p) – **1:10**, А(H3N2) – **1:320**, А(H5N1) - **<1:10**, типа В (линия В/Виктория/2/87) - **<1:10**, типа В (линия В/Ямагата/16/88) - **< 1:10**.

Т.К. титр изолята в РТГА с ИАЖ к вирусу гриппа типа А(H3N2) 1:320 превышает в 16 и 32 раза титры с ИАЖ к вирусам гриппа типа А(H1N1) и А(H1N1p) соответственно, следовательно, этот изолят является вирусом гриппа типа А(H3N2).

Форма выпуска

Препарат расфасован в стеклянные или пластиковые флаконы по 1 мл и лиофилизирован. Набор упакован в коробку, в которую вложена инструкция по применению.

Условия хранения и транспортировки

Срок годности диагностического набора 2 года. Препарат с истекшим сроком годности не использовать.

Хранить лиофилизированные антигены и ИАЖ при 2 - 8°С. Растворенные ИАЖ и антигены расфасовать и хранить при -20°С.Транспортировка - всеми видами крытого транспорта при температуре от плюс 4^0С до плюс 8^0С. При нарушении условий транспортировки специфическая активность компонентов набора может снизиться. Рекламации на качество направлять на предприятие-изготовитель по адресу: 220114, Минск, ул. Филимонова, 23, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, тел. 237-62-95.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru