





УТВЕРЖДАЮ
Врио директора
ФКП «Ставропольская биофабрика»

А.Г. Пильтяй

» 08 _____ 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н5 в реакции торможения гемагглютинации «РТГА-ВГП-СтавБио»

(Организация-разработчик: ФКП «Ставропольская биофабрика», Российская Федерация,
355019, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Биологическая, д. 18)

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н5 в реакции торможения гемагглютинации (далее по тесту – набор) предназначен для выявления специфических антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н5 в сыворотке крови сельскохозяйственных, синантропных, диких и экзотических птиц в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) при осуществлении серологического мониторинга распространения вируса в популяциях, для оценки эффективности иммунизации поголовья и с целью ретроспективной диагностики гриппа у всех видов птиц.

Только для профессионального использования.

Грипп типа А вызывается вирусами семейства *Orthomyxoviridae*, относящимися к роду *influenzavirus A*. Вирусы гриппа А являются единственными известными ортомиксовирусами, способными заражать птиц в естественных условиях.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 КОМПЛЕКТНОСТЬ

В потребительскую упаковку набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н5 в реакции торможения гемагглютинации входят:

- антиген вируса гриппа птиц (ВГП) подтипа Н5 инактивированный, жидкий, объем 2 мл - 2 флакона;
- сыворотка крови кур к вирусу гриппа птиц подтипа Н5 инактивированная, гипериммунная, жидкая (положительный контроль), объем 1 мл – 1 флакон;
- сыворотка крови кур инактивированная, нормальная, не содержащая антител к гриппу птиц, жидкая (отрицательный контроль) объем 1 мл – 1 флакон;
- инструкция по применению.

2.2 КОЛИЧЕСТВО АНАЛИЗИРУЕМЫХ ПРОБ

Потребительская упаковка набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н5 в реакции торможения гемагглютинации рассчитана на 200 определений (не менее) микрометодом, включая контрольные образцы.

2.3 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Реакция торможения гемагглютинации основана на блокаде антигена вируса гриппа птиц подтипа Н5 специфическими антителами, содержащимися в сыворотке крови птиц, в результате чего вирус утрачивает способность агглютинировать эритроциты. Визуально этот эффект проявляется в «торможении» гемагглютинации. При положительной РТГА образуется плотный осадок эритроцитов на дне лунки в виде диска или кольца с ровными краями.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРЕПАРАТА

3.1 ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИГЕНА

Не менее 1:64

3.2 СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНТИГЕНА

Антиген должен быть активен только с гомологичной сывороткой.

3.3 АКТИВНОСТЬ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ

Не менее 1:128.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

4.1 ИНФОРМАЦИЯ ОБ ИНФЕКЦИОННЫХ ИЛИ МИКРОБНЫХ РИСКАХ

Набор предназначен к применению в учреждениях, имеющих Лицензию на деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных I-IV групп патогенности, стационарных и мобильных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на проведение работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

4.2. ИНФОРМАЦИЯ ОБ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ РИСКАХ

Уничтожение неиспользованных компонентов набора или набора с истекшим сроком годности проводить в соответствии с Санитарными правилами и нормами.

4.3 ИНФОРМАЦИЯ О ФИЗИЧЕСКИХ РИСКАХ, В ТОМ ЧИСЛЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ВЗРЫВА ИЛИ ВОЗГОРАНИЯ

Набор следует применять по назначению в комбинации приборами, прошедшими надлежащее техническое обслуживание. Необходимо строгое соблюдение инструкций по эксплуатации электрооборудования, безопасности при работе с электроприборами.

4.4 ИНФОРМАЦИЯ О РИСКАХ ПРИМЕНЕНИЯ, ПРИВОДЯЩИХ К ОШИБОЧНОМУ РЕЗУЛЬТАТУ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- использование набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 в реакции торможения гемагглютинации с истекшим сроком годности;
- нарушение условий транспортирования, хранения набора;
- нарушения упаковки и внешнего вида компонентов набора;
- нарушение условий транспортирования, хранения и подготовки проб;
- нарушение условий окружающей среды при эксплуатации набора;
- нарушение процесса проведения анализа, регистрации и учета результатов.

4.5 ВСЕ КОМПОНЕНТЫ НАБОРА В ИСПОЛЬЗУЕМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ЯВЛЯЮТСЯ НЕТОКСИЧНЫМИ.

При попадании компонентов набора на открытые участки тела или слизистую оболочку глаз, рта, носа их тщательно промывают водой.

4.6 НАБОР СЛЕДУЕТ ХРАНИТЬ В МЕСТАХ, НЕ ДОСТУПНЫХ ДЛЯ ДЕТЕЙ.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Для работы с набором необходимы следующие оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- планшет полимерный для иммунологических реакций однократного применения (стерильный) круглодонный с объемом лунки 0,4 мл;
- дозаторы полуавтоматические с переменным объемом со сменяемыми наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 2-40 мкл, 50-200 мкл, 200-1000 мкл, аттестованные по объему средней дозы и сходимости результатов пипетирования (отклонение не более 3 %);
- дозатор полуавтоматический многоканальный с переменным объемом со сменяемыми наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкости 25-300 мкл, аттестованный по объему средней дозы и сходимости результатов пипетирования (отклонение не более 3 %);

- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С;
- водяная баня для инактивации сывороток с температурой нагрева (56 ± 1) °С;
- центрифуга лабораторная со скоростью вращения ротора не менее 1500 об/мин;
- фосфатный буферный раствор (ФБР), рН 7,2-7,4;
- раствор натрия лимоннокислого, 2,5%;
- взвесь куриных эритроцитов, 1%;
- вода дистиллированная;
- мерная лабораторная посуда.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотки крови сельскохозяйственных, синантропных, диких и экзотических птиц вакцинированных или с подозрением на инфицирование гриппом птиц.

Информация об интерферирующих веществах – отсутствует.

7 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

Набор извлекают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре от 18 до 22 °С не менее 30 мин.

7.1 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед проведением анализа антиген вируса гриппа птиц (ВГП) подтипа Н5 инактивированный, жидкий тщательно встряхивают до образования равномерной взвеси.

7.1.1 Приготовление ФБР

4,0 г натрия хлористого, 0,61 г натрия фосфорнокислого двузамещенного двуводного и 0,1 г калия фосфорнокислого однозамещенного растворить в 500 мл дистиллированной воды.

7.1.2 Приготовление 2,5% раствора лимоннокислого натрия

2,5 г натрия лимоннокислого, 0,83 г натрия хлористого растворить в 100 мл дистиллированной воды.

7.1.3 Приготовление 1% суспензии куриных эритроцитов

Для получения эритроцитов используют кур или петухов старше 6 месяцев, не имеющих антител к ВГП.

Кровь берут из подкрыльцовой вены в пробирки с 2,5% раствором лимоннокислого натрия в соотношении 1:2. Полученную кровь трижды отмывают ФБР путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10-15 мин. Из осадка эритроцитов готовят 1% суспензию на ФБР. Для этого к 99 мл ФБР добавляют 1 мл концентрата эритроцитов. Хранят концентрат эритроцитов при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток (до появления признаков гемолиза эритроцитов), 1% суспензию используют в день приготовления.

7.2 ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Пробы крови отбирают из подкрыльцовой вены в количестве 1-2 мл в пробирки, увлажненные ФБР. Кровь выдерживают до образования сгустка при комнатной температуре или в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 1-2 часов, затем обводят иглой или пастеровской пипеткой, отслаивая сгусток крови от стенок пробирки, и оставляют на 16-18 ч при температуре от 2 до 8 °С. Образовавшуюся прозрачную без признаков гемолиза, хилеза и микробиологической порчи сыворотку отбирают с помощью пипетки в отдельные, чистые пробирки и используют для постановки РТГА.

Для удаления термолабильных ингибиторов сыворотки прогревают в водяной бане при температуре (56 ± 1) °С в течение 30 мин.

Образцы сыворотки крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием течение 10-15 мин при 1500 об/мин.

Допускается хранение исследуемого материала на протяжении 4 дней при температуре от 2 °С до 8 °С, если требуется более длительное хранение допускается однократное замораживание сывороток при температуре минус 80 °С. После

размораживания образцы следует тщательно перемешать.

Также допускается консервация путем добавления мертиолята натрия до концентрации 1:10 000.

7.3 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Анализ проводят в лунках планшета круглодонного для иммунологических реакций однократного применения с объемом лунок 0,4 мл – микрометодом.

РТГА проводят в два этапа:

- определение гемагглютинирующего титра антигена в реакции гемагглютинации (РГА) для расчета рабочей дозы;
- определение титра антител в пробах сыворотки крови.

7.3.1 Постановка РГА

Для постановки РГА готовят двукратные разведения антигена от 1:2 до 1:2048. Для этого во все лунки планшета вносят ФБР в объеме 25 мкл или 50 мкл, затем в первую лунку вносят антиген ВГП в объеме 25 мкл или 50 мкл, трехкратно пипетируют и переносят 25 мкл или 50 мкл во вторую лунку и т.д. до одиннадцатой. Из последней лунки после трехкратного пипетирования удаляют 25 мкл или 50 мкл соответственно. В 12-ую лунку антиген не вносят.

Определение титра антигена сопровождается постановкой отрицательного контроля на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов (по которому определяется время учета реакции), с этой целью в двенадцатые лунки планшета вместо антигена вносят дополнительно 25 мкл или 50 мкл ФБР.

Затем во все лунки планшета вносят по 25 мкл или 50 мкл 1% суспензии эритроцитов.

Планшет аккуратно встряхивают и оставляют при комнатной температуре от 18 до 22 °С на 40 мин до полного оседания эритроцитов в контрольных лунках¹ (см. ниже).

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

Примечание: При наличии спонтанной агглютинации приготовленной 1% суспензии эритроцитов ее необходимо заменить.

РГА оценивают положительно при оседании эритроцитов в виде хорошо выраженного «зонтика», отрицательно – в виде «пуговики».

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

Примечание: Получение нечетких результатов может быть обусловлено изменением рН ФБР или индивидуальными особенностями птиц-доноров эритроцитов.

7.3.2 Подготовка рабочей дозы антигена

Для постановки РТГА готовят рабочую дозу антигена (4 ГАЕ), исходя из его титра, установленного в РГА (п.7.3.1). Для этого антиген разводят ФБР во столько раз, сколько получают от деления его титра на 4 (четыре)².

Объем рабочей дозы антигена определяют исходя из количества подлежащих исследованию сывороток.

Рабочую дозу антигена готовят непосредственно перед постановкой реакции с обязательным контролем точности приготовления рабочей дозы (4 ГАЕ). Для этого в 4 лунки планшета добавляют ФБР в объеме, выбранном для постановки реакции (25 мкл или 50 мкл), затем в первую лунку добавляют равный объем подготовленной рабочей дозы

¹ Если комнатная температура выше указанной, планшет оставляют при температуре от 2 °С до 8 °С на 60 мин.

² Например, титр антигена, определенный в РГА, $8,0 \log_2 (1:256)$. Для приготовления рабочего разведения (4 ГАЕ) необходимо взять 63 мл ФБР и 1 мл исходного антигена ($256/4=64$).

антигена (4 ГАЕ) и после трехкратного пипетирования переносят 25 мкл или 50 мкл во вторую лунку и т.д. Из четвертой лунки 25 мкл или 50 мкл антиген удаляют в дезинфицирующий раствор. После этого в каждую лунку добавляют 1% суспензию эритроцитов в объеме, равном исходному объему ФБР.

В две лунки планшета с двойным объемом ФБР (50 мкл или 100 мкл) добавляют по 25 мкл или 50 мкл 1% суспензии эритроцитов – отрицательный контроль.

Планшет аккуратно встряхивают и оставляют при комнатной температуре от 18 до 22 °С до полного оседания эритроцитов в контрольных лунках.

При правильном определении рабочей дозы, в первой и второй лунках, содержащих 2 и 1 ГАЕ, должна быть полная агглютинация («зонтик»), в третьей (0,5 ГАЕ) – частичная агглютинация, в четвертой (0,25 ГАЕ) - отсутствие агглютинации (четко выраженный диск «пуговка» осевших эритроцитов).

Полная агглютинация в третьей лунке означает, что выбранная доза антигена завышена, а отсутствие агглютинации в первой или во второй лунках свидетельствуют о недостаточном его количестве. Корректирование рабочей дозы (увеличение или уменьшение) проводят путем добавления антигена или ФБР с обязательным повторным контролем 4 ГАЕ.

Примечание: Допускается использование в реакции 4-8 ГАЕ антигена.

7.3.3 Определение титра антител в пробах сыворотки крови

Для постановки реакции во все лунки планшета вносят ФБР в объеме 25 мкл или 50 мкл. Затем в первую лунку добавляют равный объем испытуемой сыворотки, подготовленной по п.7.2, трижды пипетируют и готовят ряд последовательных двукратных разведений 1:2 – 1:2048. Последнюю лунку каждого ряда планшета используют для контроля сыворотки на отсутствие изоагглютинации.

После этого во все лунки вносят рабочее разведение антигена в объеме 25 мкл или 50 мкл, планшет осторожно встряхивают и оставляют при комнатной температуре от 18 до 22 °С на 30 мин или при температуре от 2 °С до 8 °С на 60 мин.

Затем в каждую лунку добавляют двойной объем (50 мкл или 100 мкл) 1% суспензии эритроцитов.

Одновременно ставят контроль:

- контроль 1 – эритроцитов на спонтанную агглютинацию (суспензия эритроцитов + ФБР в двойном объеме);

- контроль 2 – сыворотки для исключения присутствия изоагглютининов к эритроцитам (испытуемая сыворотка + ФБР в равных объемах + суспензия эритроцитов в двойном объеме);

- контроль 3 – специфичности антигена (положительный и отрицательный контроль). В два ряда планшета вносят по 25 или 50 мкл ФБР, затем в первые лунки каждого ряда добавляют в равном объеме специфическую гипериммунную (положительную) и нормальную (отрицательную) сыворотки, трижды пипетируют и готовят последовательные двукратные разведения 1:2-1:2048. После этого в лунки вносят рабочую дозу антигена в выбранном объеме для постановки реакции, осторожно встряхивают и оставляют при комнатной температуре от 18 до 22 °С на 30 мин или при температуре от 2 °С до 8 °С на 60 мин. Затем в каждую лунку добавляют по 25 мкл или 50 мкл 1% суспензии эритроцитов.

Примечание: Контроль специфичности антигена рекомендуется выполнять в двух повторах.

Планшеты аккуратно встряхивают и оставляют при комнатной температуре от 18 до 22 °С 40 мин или при температуре от 2 °С до 8 °С на 60 мин.

8 УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет и регистрация результатов проводят визуально без использования дополнительного оборудования.

Учет результатов РТГА проводят после полного оседания эритроцитов (в виде «пуговки») в контрольных лунках.

Агглютинация эритроцитов в контролях 1, 2 должна отсутствовать.

Контроль 3 – специфическая гипериммунная сыворотка должна тормозить гемагглютинирующую активность 4-8 ГАЕ антигена в титре, указанном на этикетке флакона.

Если полученные результаты контролей не соответствуют указанным требованиям, результаты реакции считают не достоверными и реакцию повторяют.

Титром сыворотки считают наибольшее ее разведение, дающее полное торможение гемагглютинации рабочей дозы антигена ВГП.

Результат исследования считается положительным, если титр сыворотки составляет $6,0 \log_2$ (1:64) и выше. При использовании в реакции 8 ГАЕ результат исследования считается положительным, если титр сыворотки имеет значение $3,0 \log_2$ (1:8) и выше.

В случае проявления изоагглютинации к 50 мкл сыворотки добавляют 25 мкл осадка отмытых эритроцитов, тщательно встряхивают и выдерживают не менее 30 мин при комнатной температуре. Затем эритроциты осаждают центрифугированием при 1500 об/мин в течение 3-5 мин. Сыворотку декантируют и используют для повторной постановки реакции.

9 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ НАПРЯЖЕННОСТИ ИММУНИТЕТА У ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПТИЦ.

Эффективность вакцинопрофилактики гриппа птиц определяют по результатам РТГА в соответствии с инструкцией по применению вакцинного препарата, используемого для иммунизации.

В случае обнаружения специфических антител к ВГП подтипа Н5 у не вакцинированных птиц проводят мероприятия в соответствии с Ветеринарными правилами.

9.2 РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИППА ПТИЦ

Ретроспективную диагностику гриппа птиц проводят по приросту титров антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н5.

Парные сыворотки крови 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 и исследуют одновременно.

Получение, подготовку и исследование сывороток в РТГА проводят по 7.3.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Транспортирование наборов осуществляют всеми видами крытых транспортных средств с соблюдением условий и требований, установленных на данном виде транспорта, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 15 сут.

Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С в сухом, защищенном от света месте в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре до 25 °С не более 15 сут.

Срок годности набора – 12 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Сроки годности компонентов набора после вскрытия:

Антиген вируса гриппа птиц подтипа Н5 инактивированный, жидкий	В течение 5 сут. при температуре хранения от 2 до 8 °С
Сыворотка крови кур к вирусу гриппа птиц подтипа Н5 инактивированная, гипериммунная, жидкая (положительный контроль)	
Сыворотка крови кур инактивированная, нормальная, не содержащая антител к гриппу птиц, жидкая (отрицательный контроль)	

Замораживание компонентов набора не допускается.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

Не допускается использование компонентов из наборов, производимых другими фирмами.

11 БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Утилизация набора, не прошедшего контроль, а также серий с истекшим сроком годности не требует специальных мер безопасности.

Флаконы из набора вскрывают и погружают в емкость с водой. После экспозиции, приводящей к утрате товарного вида, жидкую часть сливают в канализацию, твердые отходы сбрасывают в контейнеры для сбора отходов.

Потенциально инфицированные отходы биоматериала подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) / обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания / обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей ветеринарную лабораторную деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с биологическими отходами.

Инструкция разработана: ФКП «Ставропольская биофабрика», 355019, Российская Федерация, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Биологическая, д.18.

Организация-производитель: ФКП «Ставропольская биофабрика», 355019, Российская Федерация, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Биологическая, д.18.