

Инструкция по применению набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H₉N₂ в реакции торможения гемагглютинации

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1) Набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц (ГП) подтипа H₉N₂ в реакции торможения гемагглютинации.

2) В состав набора входят:

- Инактивированный антиген вируса ГП подтипа H₉N₂ в лиофилизированном виде, расфасованный по 2 см³, во флаконы соответствующей вместимости. Один набор включает в себя 5 флаконов антигена, гемагглютинирующая активность которых составляет не менее 7 log₂ (1:128 и выше), или 10 флаконов антигена с гемагглютинирующей активностью 6 log₂ (1:64). Расчетное количество сывороток, которое можно исследовать в РТГА с использованием антигенов различной активности:

1 флакон антигена с активностью 1:64 – 53 пробы сывороток;

1 флакон антигена с активностью 1:128 – 106 проб сывороток;

1 флакон антигена с активностью 1:256 – 213 проб сывороток;

1 флакон антигена с активностью 1:512 – 426 проб сывороток.

Таким образом, при использовании одного набора минимальное количество испытуемых сывороток составляет не менее 500 образцов;

- Положительная сыворотка крови кур к вирусу ГП подтипа H₉N₂ (положительный контроль) в лиофилизированном виде, расфасованная по 1 см³. В один набор входит 1 флакон с положительной сывороткой;

- Отрицательная (нормальная) сыворотка кур, не содержащая антител к вирусу ГП подтипа H₉N₂ (отрицательный контроль) в лиофилизированном виде, расфасованная по 1 см³. В один набор входит 1 флакон с отрицательной сывороткой;

- Планшет полимерный для иммунологических реакций однократного применения, стерильный – 5 шт;

- Таблетки фосфатно-солевого буфера (PBS) pH 7,2–7,6 – 10 шт;

- Натрий лимоннокислый (цитрат), расфасованный по 1 г. во флаконы объемом 2 см³ – 3 шт.

3) По внешнему виду инактивированный антиген вируса ГП представляет собой сухую пористую массу белого или светло-желтого цвета. Положительная сыворотка крови кур в лиофилизированном виде представляет собой сухую пористую массу светло-желтого или красноватого цвета. Нормальная сыворотка крови кур в лиофилизированном виде представляет собой сухую пористую массу белого или светло-желтого цвета.

Иммуноспецифические компоненты набора в лиофилизированном виде полностью растворяются в растворе PBS в течение 5 мин.

4) Лيوфилизированные компоненты набора расфасованы в стеклянные, укупоренные алюминиевыми колпачками, флаконы соответствующей вместимости.

На флаконы с компонентами наклеивают этикетки с указанием: наименования организации-производителя и/или ее товарного знака, наименования компонента, объема во флаконе, номера серии, даты изготовления (месяц, год) и активности антигена и положительной сыворотки.

Этикетированные флаконы с компонентами набора упаковывают в пластиковые/картонные коробки, обеспечивающие целостность компонентов.

На коробку наклеивают этикетку, на которой указывают: наименование организации-производителя, ее адрес и товарный знак, наименование набора, перечень и количество его компонентов, номера серии набора, дату изготовления (месяц, год), срок годности (мес, год), условия хранения и транспортирования,

обозначение настоящего стандарта, знак соответствия, и надпись «Для ветеринарного применения».

В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

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

Компоненты вскрытого набора рекомендуется использовать при соблюдении условий хранения.

Срок годности набора 24 месяца с даты изготовления при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С.

Набор по истечении срока годности к применению не пригоден. Допускается транспортирование наборов в упаковке организации-производителя или термоконтейнерах многоразового использования при температуре не выше 25 °С. При этом срок транспортирования не должен превышать 5 суток. После первого вскрытия флакона антигена или сыворотки, их необходимо использовать в течение 24 часов, а растворенные положительные и нормальные сыворотки рекомендуется хранить при температуре минус 10 °С и не более одного месяца (в течение срока хранения размораживание допускается 2-3 раза).

6) При нарушении целостности и укупорки флаконов, изменении цвета их содержимого и посторонних примесей, при отсутствии этикеток, а также в случае неиспользования в пределах срока годности компоненты набора выбраковывают.

Утилизация наборов, не прошедших контроль, а также с истекшим сроком годности не требует специальных мер безопасности.

II. ПРИНЦИП РЕАКЦИИ

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

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8) Набор предназначен для:

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

Для постановки РТГА используют:

- пипетки одно - и восьмиканальные автоматические фиксированного и переменного объема до 0,02 см³, 0,2 см³, 1,0 см³ со сменными наконечниками;
- посуду мерную лабораторную;
- термостат с поддержанием температуры (37,0±0,5) °С;
- холодильник бытовой.

9) Приготовление фосфатно-солевого буфера

Для приготовления 0,01М фосфатно-солевого буфера, содержащего 0,137 моль/л NaCl и 0,0027 моль/л KCl, необходимо растворить 1 таблетку (PBS) в 100 мл дистиллированной воды.

Использовать только для «*in vitro*» диагностики.

10) Приготовление консервирующего раствора лимоннокислого натрия

Для приготовления, консервирующего 5% раствора лимоннокислого натрия необходимо: 1,0 г кристаллического лимоннокислого натрия растворить в 20 мл раствора фосфатно-солевого буфера (PBS). Стабилизацию крови проводят путем смешивания полученного раствора с кровью петухов в соотношении 2:1 (две части раствора на одну часть крови). Стабилизированную кровь необходимо обработать в течение 4 часов после взятия, проведя трехкратное отмывание эритроцитов в растворе PBS методом центрифугирования при 1000-1500 об/мин в течение 3-5 минут на каждой стадии. После последнего центрифугирования из осадка эритроцитов готовят 0,75 или 1% рабочую суспензию эритроцитов. Суспензия

эритроцитов с концентрацией 0,75% позволят получать более четкую визуализацию формирования «пуговок» и «зонтиков» при постановке реакции. Важным фактором является то, что при постановке РТГА исследований на потоке (постоянно), необходимо использовать одну и ту же концентрацию эритроцитарной массы (0,75 или 1,0%-ную суспензию).

11) Подготовка иммуноспецифических компонентов набора.

11.1) Содержимое флакона с антигеном растворить в 2,0 см³ раствора PBS. Подготовленный антиген рекомендуется хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов.

11.2) Содержимое флакона с положительной сывороткой растворить в 1,0 см³ раствора PBS. Подготовленную положительную сыворотку рекомендуется хранить при температуре минус 10 °С и не более одного месяца. В течение срока хранения размораживание допускается 2-3 раза.

11.3) Содержимое флакона с нормальной сывороткой растворить в 1,0 см³ раствора PBS. Подготовленную сыворотку рекомендуется хранить при температуре минус 10 °С и не более одного месяца. В течение срока хранения размораживание допускается 2-3 раза.

11.4) Для получения эритроцитов используют кур или петухов-доноров, не имеющих антител к вирусу ГП.

Кровь берут из подкрыльцовой вены во флаконы с раствором натрия лимоннокислого в соотношении 1:2, трижды отмывают раствором PBS путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 10 мин. Из осадка эритроцитов на основе PBS готовят 0,75% суспензию. Для этого в 99,25 см³ PBS добавляют 0,75 см³ концентрата эритроцитов (осадок). Для приготовления 1,0%-ной суспензии эритроцитов, 1,0 см³ концентрата эритроцитарной массы ресуспендируют в 99,00 см³ PBS. Хранить суспензию можно при температуре от 2 °С до 8 °С до появления признаков гемолиза эритроцитов.

12) 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 PBS. Образовавшийся сгусток отделяют от стенок тонким металлическим стержнем или пастеровской пипеткой и выдерживают при комнатной 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 температуре 56 °С в течение 30 мин.

13) РТГА проводят в три этапа:

- определение гемагглютинирующего титра антигена в реакции гемагглютинации (РГА);
- подготовка рабочей дозы антигена;
- выявление специфических антител в пробах сыворотки крови.

13.1) Постановка реакции гемагглютинации

Для постановки РГА готовят двукратные разведения антигена от 1:2 до 1:4096. С этой целью во все лунки планшета пипеткой следует внести раствор PBS (0,025 см³). В первую лунку горизонтального ряда добавить равный объем подготовленного антигена вируса ГП, трехкратно пипетировать и перенести по 0,025 см³ во вторую лунку и т.д. Из последней лунки удалить по 0,025 см³ испытуемого материала в 2%-ый раствор едкого натрия или другой подобный дезинфектант.

После разведения антигена во все лунки внести 0,75% или 1,0% -ную суспензию эритроцитов в объеме 0,05 см³. Планшет аккуратно встряхнуть и оставить при температуре 20-25 °С на 30-40 мин.

Для контроля эритроцитов на отсутствие спонтанной агглютинации и определения времени учета реакции, в две-три лунки планшета с двойным объемом PBS (0,05 см³) необходимо добавить по 0,025 см³ 0,75% или 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 «пуговки» 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 PBS или индивидуальными особенностями птиц-доноров эритроцитов.

13.2) Подготовка рабочей дозы антигена

Для постановки РТГА готовят рабочую дозу антигена (4 ГАЕ), исходя из его титра, установленного в РГА (п.13.1.).

Для этого исходный антиген разводят раствором PBS 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 PBS 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 PBS).

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

Для этого в 4 лунки необходимо разлить PBS в объеме, выбранном для постановки реакции. В первую лунку добавить равный объем рабочей дозы антигена и титровать согласно п. 13.1.

13.4) 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 ½ 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) антигена проводят путем добавления антигена или раствора PBS с обязательным повторным контролем 4 ГАЕ.

13.5) Выявление специфических антител в пробах сыворотки крови

13.5.1) Во все лунки планшета внести раствор PBS в объеме 0,025 см³. Затем в первую лунку горизонтального ряда добавить равный объем испытуемой сыворотки, подготовленной по п. 12., 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 0,025 см³, осторожно встряхнуть и после 30 мин контакта при температуре 20–25 °С в каждую лунку добавить 0,05 см³ 0,75 или 1,0 % суспензии эритроцитов.

Планшет аккуратно встряхнуть и оставить при температуре 20-25 °С на 30-40 мин.

13.5.2) Одновременно ставят контроли реакции:

- на отсутствие изоагглютинации сывороток - в одну лунку планшета внести 0,025 см³ раствора PBS, добавить равный объем испытуемой сыворотки и 0,75 или 1,0 %-ной суспензии эритроцитов. Агглютинация эритроцитов должна отсутствовать. В случае проявления изоагглютинации к 0,05 см³ сыворотки добавить 0,025 см³ осадка отмытых эритроцитов, тщательно встряхнуть и выдержать не менее 30 мин при комнатной температуре. Затем эритроциты осадить центрифугированием при 1500 об/мин (800 g) в течение 3-5 мин. Сыворотку декантировать и использовать для повторной постановки реакции.

- на спонтанную агглютинацию эритроцитов - к двойному объему раствора PBS добавить 0,025 см³ 0,75 или 1,0 %-ной суспензии эритроцитов. Спонтанная агглютинация эритроцитов должна отсутствовать.

- контроль активности положительной и отрицательной сывороток крови - в лунки одного ряда планшета внести по 0,025 см³ раствора PBS. 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 18–22 °С или 60 мин при температуре 2–8 °С, после чего в каждую лунку добавить по 0,05 см³ 0,75 или 1,0 %-ной суспензии эритроцитов. Контрольная положительная сыворотка должна тормозить гемагглютинирующую активность 4 ГАЕ антигена в титре, указанном на этикетке флакона с положительной сывороткой + одно разведение. Нормальная сыворотка должна тормозить гемагглютинирующую активность 4 ГАЕ антигена в титре, меньшем чем 1:4.

13.5.3) 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 ГП.

Исследуемая сыворотка оценивается положительно, если она содержит специфические к вирусу ГП антитела в титре 1:8–1:16 (3,0–4,0 log₂) и выше.

14) Интерпретация полученных результатов

По результатам РТГА определяют эффективность иммунизации в партии привитых птиц путем деления суммарного количества проб с титром антител 1:32 и выше (после применения инаktivированных вакцин) на общее число исследованных сывороток и выражают в процентах.

Птицу считают иммунной к вирусу ГП при эффективности иммунизации 80 и более процентов после применения инаktivированных препаратов.

Обнаружение в РТГА высокого титра антител (1:4096 и выше у птиц, привитых инаktivированными вакцинами) свидетельствует о возможной циркуляции в стаде полевого вируса ГП. 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.

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

Нарастание 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 ГП у птиц, не привитых против ГП, без клинических и патологоанатомических признаков заболевания, свидетельствует о циркуляции полевых лентогенных штаммов вируса ГП и не является основанием для объявления хозяйства неблагополучным по ГП. За птицей таких хозяйств устанавливают постоянное наблюдение.

IV) МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

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

16) Все лица, участвующие в проведении испытаний, должны быть одеты в спецодежду (халат, брюки, головной убор, резиновые перчатки) и обеспечены индивидуальными средствами защиты. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

17) При работе с набором следует избегать нарушения целостности стеклянных флаконов, в которые расфасованы компоненты набора.

При нарушении целостности флаконов и порезах рук стеклом, первую помощь оказывают согласно общепринятым методикам.

18) Запрещается прием пищи и воды, курение в помещении, где проводятся работы с компонентами

набора.

19) Набор следует хранить в местах, не доступных для детей.

Генеральный директор
ООО «ЦБО Микроэкологии»

Директор по разработке
ООО «ЦБО Микроэкологии»



Стрельников А.Д.

Лаишевцев А.И.