

по применению диагностикумов гриппозных для реакции торможения гемагглютинации сухих (ДИГ)

Диагностикумы гриппозные для реакции торможения геагглютинации (РТГА) сухие представляют собой серотипы В, А (сероподтипы Н1Н1, Н2Н2, Н3Н2, Н5Н1, Нsw1Н1 и другие) вируса гриппа, антигенно актуальные, авидные к антителам, но резистентные к неспецифическим ингибиторам геагглютинации сывороток людей, выращенные в аллантоисной полости куриных эмбрионов, инактивированные. Титр в реакции геагглютинации не ниже 1:160. Препарат разлит в ампулы или флаконы по 0,5 или по 1 мл и лиофилизирован, имеет вид аморфной массы белого или светло-желтого цвета.

НАЗНАЧЕНИЕ

Диагностика гриппозной инфекции по выявлению прироста антител в сыворотках реконвалесцентов, оценка коллективного иммунитета, оценка иммуногенности гриппозных вакцин, научные исследования.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Определение титра геагглютининов

Сухой препарат диагностикума в день постановки РТГА растворяют фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ)* рН 7,0-7,2 до объема, указанного на этикетке. После этого препарат разводят в микропланшете с помощью ФСБ с коэффициентом 2, начиная с 1:10 до 1:1280 в объеме 50 мкл. Для этого в лунки №№ 2-12 микропланшета вносят по 50 мкл ФСБ. В первую лунку вносят 100 мкл диагностикума, разведенного 1:10. Для приготовления двукратных разведений переносят по 50 мкл диагностикума из лунки в лунку при тщательном перемешивании, начиная с первой по восьмую лунку включительно, сбрасывая 50 мкл конечного разведения. В каждую лунку добавляют по 50 мкл ФСБ и по 100 мкл 0,5% суспензии куриных эритроцитов (КЭ). Планшеты встряхивают постукиванием рукой о край планшета или поместив их в шейкер и оставляют неподвижно на 30-40 мин при комнатной температуре до полного оседания КЭ в контрольных лунках (№№ 9-12) планшета. Наибольшее разведение вируса, при котором регистрируется полная агглютинация КЭ, принимается за титр геагглютининов.

Критерии учета РГА:

- +++ полная агглютинация эритроцитов в виде однородной взвеси или пленки на дне лунки
- ++ частичная геагглютинация в виде однородной пленки на дне лунки, сочетающаяся с оседанием части эритроцитов в вид компактного осадка на дне лунки
- ± незначительная геагглютинация в сочетании с оседанием эритроцитов в виде компактного осадка на дне лунки
- 0 отсутствие агглютинации эритроцитов, компактный осадок эритроцитов на дне лунки

НАПРИМЕР: если полная агглютинация эритроцитов наблюдается в разведении 1:320, титр вирусных геагглютининов (ГА) в составе данного вирусосодержащего материала соответствует 1:320.

2. Приготовление стандартизированного антигена для РТГА.

Единица ГА (ГAE) не является мерой измерения абсолютного количества вируса, но является «операционной» единицей, зависящей от методических особенностей титрования ГА (объемы реагентов, концентрация, вид эритроцитов и т.д.)

ГAE определяется как количество вируса, необходимое для агглютинации равного объема 0,5% суспензии КЭ.

2.1. Определение объема стандартизованного по содержанию ГА антигена (СА), необходимого для постановки РТГА.

НАПРИМЕР: 4 мл СА достаточно для исследования 10 сывороток, каждая из которых разведена в 8 лунках, при условии, что в каждую лунку добавлено по 50 мкл антигена (50 мкл x 10 сывороток x 8 лунок = 4 мл СА).

Для процедуры "повторного титрования" и с учетом потерь необходимо приготовить дополнительно 4 мл СА.

2.2. Определение разведения диагностикума

Стандартизованный антиген (СА) должен содержать 4 ГAE в 50 мкл раствора, добавляемого к двукратным разведениям сыворотки. Необходимое разведение диагностикума определяют делением титра геагглютининов, который был определен в объеме 50 мкл, на 4. Например, при титре ГА 1:320, диагностикум разводят в 80 раз ($320:4=80$). Для этого 0,1 мл диагностикума добавляют к 7,9 мл ФСБ.

* 0,01 моль/л ФСБ, рН 7,0-7,2. 38,25 г натрия хлористого и 7,12 г натрия фосфорнокислого двузамещенного последовательно растворяют в 4,5 л дистиллированной воды (раствор А). 4,25 г натрия хлористого и 1,36 г калия фосфорнокислого однозамещенного последовательно растворяют в 0,5 л дистиллированной воды (раствор В). Добавляют раствор В к раствору А до получения рН 7,2-7,5. Хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 недели.

В соответствии с количеством исследуемых сывороток необходимо рассчитать и приготовить стандартизованный антиген в необходимом объеме, как указано выше, зарегистрировав использованное соотношение антигена и ФСБ.

2.3. Контроль дозы СА повторным титрованием.

Стандартизованный антиген должен содержать 4 ГАЕ/50 мкл. При титровании СА в объеме 50 мкл с внесением в первую лунку 100 мкл неразведенного СА и приготовлением его двукратных разведений в последующих 5 лунках, полная агглютинация должна регистрироваться в первых 3 лунках планшета. Если СА не содержит 4 ГАЕ/50 мкл, он доводится до нужной дозы добавлением соответствующего количества ФСБ, если титр выше 4, или исходного разведения диагностикума, если титр ниже 4.

НАПРИМЕР: Если полная гемагглютинация наблюдается в 4 лунках (титр 1:8), приготовленный антиген следует развести в 2 раза. Наоборот, в случае, если агглютинация наблюдается только в 2 лунках, в приготовленный антиген необходимо добавить исходное разведение диагностикума в том же количестве, что и при первичном приготовлении раствора.

После тщательного перемешивания контрольное титрование СА повторяют, доводя его концентрацию до 4 ГАЕ/50 мкл.

3. Постановка реакции торможения гемагглютинации (РТГА)

Исследуемые сыворотки** разводят с помощью ФСБ в соотношении 1:5 и прогревают в водяной бане при 56 °С в течение 30 мин.

Парные сыворотки от каждого больного исследуют в одном опыте. Готовят серию двукратных разведений сывороток на ФСБ (от 1:10 до 1:1280) в объеме 50 мкл. Для этого в 8-лунок каждого ряда вносят по 50 мкл ФСБ. В первую лунку вносят 50 мкл исследуемой сыворотки, разведенной в 5 раз и прогретой при 56° С, и после 3-х кратного перемешивания, переносят 50 мкл разведенной сыворотки в следующую лунку, процедуру повторяют, титруя сыворотку, из последней (8-ой) лунки избыток (50 мкл) разведенной до 1:1280 сыворотки, сбрасывают. К каждому разведению сыворотки добавляют по 50 мкл (4 ГАЕ) стандартизованного гриппозного антигена. Панели встряхивают и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого в каждую лунку, включая контрольные (по 100 мкл ФСБ), добавляют по 100 мкл 0,5% КЭ.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты реакции учитывают после оседания эритроцитов в контрольных лунках планшета (через 30-40 мин). Титром сыворотки считают ее наибольшее разведение, при котором наблюдается полная ингибция агглютинации эритроцитов в результате взаимодействия вируса со специфическими антителами.

Диагностически достоверным считается не менее чем 4-кратное увеличение титров антител в постинфекционной сыворотке по сравнению с сывороткой острой фазы заболевания. При оценке иммуногенности вакцин проводят сравнение титров антител в сыворотках превакцинального периода и через месяц после иммунизации.

ФОРМА ВЫПУСКА

Препарат выпускают в ампулах/флаконах по 0,5 или 1 мл. Ампулы/флаконы упаковывают в коробки. Количество ампул/флаконов в коробке от 1 до 5. В коробку вкладывают Инструкцию по применению и нож ампульный.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ.

Срок годности - 2 года. Препарат с истекшим сроком годности применяться не должен.

Препарат хранят в соответствии с СП 3.3.2.028-95, с. 6 при температуре от 2 до 8°С.

Транспортирование осуществляется в соответствии с СП 3.3.2.028-95, с. 6 при температуре не выше 8°С. Допускается транспортирование при температуре не выше 22°С продолжительностью не более 14 суток.

При нарушении условий транспортировки и хранения специфическая активность диагностикумов гриппозных может понизиться.

Рекламации на специфические и физико-химические свойства препарата направляют в адрес предприятия-изготовителя:

ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов», 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 15/17, тел./факс: +7 (812) 499 15 72.

E-mail: ppdp@influenza.spb.ru

** Меры безопасности: все операции по взятию и обработке инфекционных клинических материалов проводят в стерильных резиновых перчатках и маске.