

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
(ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА)



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора, д-р биол. наук
Р.А. Максютов

« 19 » 12 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению контрольного набора (шифр-панели) антисывороток крови человека

Набор шифр-панели антисывороток содержит 8 пробирок с образцами сыворотки крови человека, обработанной азидом натрия (NaN_3) до конечной концентрации 1 г NaN_3 на 1 л сыворотки (согласно приказа МЗ РФ от 09.01.98 № 2 «Об утверждении инструкций по иммуносерологии»).

Образцы антисыворотки предназначены для проведения реакции торможения гемагглютинации (РТГА) против антигенов сезонных штаммов вируса гриппа А и В с использованием диагностикумов гриппозных для проведения реакции торможения гемагглютинации сухих (ДИГ), производства ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов», г. Санкт-Петербург.

I. Обработка сывороток RDE

1. Внесите 20 мкл образца сыворотки в пробирку.
2. Добавьте 60 мкл RDE в каждую пробирку. Закройте пробирки пробками.
3. Выдерживайте при $+37^\circ\text{C}$ от 18 до 20 часов.
4. Затем поместите пробирки в водяную баню при $+56^\circ\text{C}$ на 30 минут.
5. Добавьте 120 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), $\text{pH} = 7,2$ в каждую пробирку. Конечное разведение сыворотки 1:10.

II. Приготовление рабочего раствора антигена

1. Один ряд 96-луночного планшета с V или U-образным дном заполните ФСБ (25 мкл), внесите 25 мкл антигена в первую лунку и титруйте антиген, перенося 25 мкл в следующую лунку.
2. Внесите 25 мкл ФСБ во все лунки ряда, перемешайте постукиванием по планшету.
3. Внесите 50 мкл эритроцитов, перемешайте.
4. Сделайте контроль эритроцитов (50 мкл ФСБ+50 мкл эритроцитов) и поставьте планшет в холодильник.
5. Когда образуются «пуговки» в контроле эритроцитов, подсчитайте титр антигена. Последнее разведение антигена, образующее «зонтик», соответствует 1 гемагглютинирующей единице (1ГАЕ).
6. Рассчитайте, во сколько раз надо разбавить антиген, чтобы получить 4 ГАЕ в объеме, необходимом для анализа сывороток (например, 10 шт. образцов: 10 сывороток+положительный контроль+отрицательный контроль = 12 образцов, т.е. 1 планшет. $96 \text{ лунок} \times 25 \text{ мкл} = 2,4 \text{ мл}$. Значит надо приготовить около 3 мл рабочего раствора антигена).
7. Поставьте контроль 4 ГАЕ. Для этого в 4-5 лунок планшета внесите 25 мкл ФСБ, в первую лунку внесите 25 мкл рабочего раствора антигена и титруйте, перенося 25 мкл в следующую лунку. Добавьте во все лунки 25 мкл ФСБ и 50 мкл эритроцитов. Инкубируйте в холодильнике 30 мин и оцените результат.
8. Только если рабочий раствор содержит 4 (два «зонтика и 2-3 «пуговки») или 8 ГАЕ (три «зонтика» и 1-2 «пуговки») можно проводить анализ сывороток.

III. Реакция торможения гемагглютинации

1. Все лунки 96-луночного планшета с V или U-образным дном заполните фосфатно-солевым буфером (25 мкл), внесите 25 мкл сыворотки № 1 в первую лунку первого ряда, сыворотки № 2 в первую лунку второго ряда и т.д. до десятого ряда.
2. В первую лунку 11-го ряда внесите 25 мкл положительной сыворотки, в первую лунку 12 ряда – 25 мкл отрицательной сыворотки.
3. Титруйте сыворотки, перенося многоканальной пипеткой по 25 мкл в следующую лунку.
4. Внесите 25 мкл рабочего раствора антигена в каждую лунку и оставьте планшет при комнатной температуре на 30 минут.
5. Внесите 50 мкл эритроцитов, перемешайте постукиванием и инкубируйте в холодильнике, пока не сформируются «пуговки» в отрицательном контроле.
6. Определите титр каждой сыворотки и запишите результат в форму для заполнения.

IV. Результаты тестирования панели контрольных препаратов

1. Результаты измерения титра РТГА против каждого из 4-х антигенов вируса гриппа (А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2), В(Виктория) и В(Ямагата)) в каждом из 8-ти контрольных образцов занесите в Таблицу 1. Интерпретация результата (Приложение №3 к приказу Роспотребнадзора от 19.09.2022 г №488).

V. Используемые растворы и материалы

1. ФСБ – фосфатно-солевой буфер
Состав: 8,00 г хлорида натрия (NaCl), 0,20 г хлорида калия (KCl), 1,15 г фосфата натрия, двухосновного, безводного (Na₂HPO₄), 0,21 г фосфата калия, одноосновного, безводного (KH₂PO₄). Доведите объем дистиллированной водой до 1 литра. Доведите pH до 7,2 с помощью HCl. Стерилизуйте автоклавированием.
2. RDE - Receptor Destroying Enzyme, фермент, разрушающий неспецифические рецепторы, производства Denka Seiken, Кат № 370013.

Разработано:

Зав. лабораторией,
д-р биол. наук, доцент



Т.Н.Ильичева

Согласовано:

Зав. отделом биотехнологического
контроля, канд. биол. наук



М.П.Богрянцева