

НА

осздравнадзора

201 г. №

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН ГНЦ ПМБ

И.А. Дятлов

2013 г.



ИНСТРУКЦИЯ

к использованию Набора реагентов для одновременного определения протективного антигена и летального фактора возбудителя сибирской язвы методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа (Тест-система ИФЛА-1Ва)

1. Назначение

Тест-система ИФЛА-1Ва предназначена для одновременного определения специфических антигенов возбудителя сибирской язвы – протективного антигена (ПА) и летального фактора (ЛФ), являющихся компонентами экзотоксина *Bacillus anthracis*, в образцах сыворотки человека и лабораторных животных (биопробы). Обнаружение в крови антигенов ПА и ЛФ используют в качестве теста для ранней прижизненной диагностики сибирской язвы (МУК 43-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы»).

2. Принцип метода

Метод определения основан на использовании «сэндвич»-варианта иммунофлуоресцентного анализа (ИФЛА) с использованием моноклональных антител к различным эпитопам чужеродных антигенов. Специфические антигены ПА и ЛФ возбудителя сибирской язвы, содержащиеся в исследуемом материале, специфически взаимодействуют со связывающими моноклональными антителами (МКА), иммобилизованными на флуоресцентно окрашенных микрошарах. Каждый вид микрошар имеет свой «спектральный адрес», определяемый соотношением красного и инфракрасного красителей. Антитела к ПА и ЛФ иммобилизуют на микрошарах с разными «спектральными адресами». Таким образом, каждый антиген связывается с одним видом микрошар. В качестве детектирующих антител используют биотинилированные моноклональные антитела к протективному антигену и летальному фактору. Образовавшиеся иммунные комплексы «антитело – антиген – биотинилированное антитело» выявляют, добавляя конъюгат стрептавидина с флуоресцентным красителем фикоэритрином. Для детекции используют проточный флуориметр (система Био-Плекс) с двумя лазерами: первый лазер опре-

34

деляет «спектральный адрес» микросфер, и тем самым анализируемый антиген, второй лазер определяет интенсивность флуоресценции фикоэритрина. Использование в сконструированной тест-системе высокоспецифических моноклональных антител обеспечивает обнаружение в исследуемых образцах только ПА и ЛФ возбудителя сибирской язвы.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

3. Характеристика набора

В состав набора реагентов входят компоненты, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Состав набора

Наименование	Количество
1. Планшет 96-луночный полистироловый с фильтрующим	1 планшет
2. Пробирка № 1 (суспензия микросфер № 36 с иммобилизованными на их поверхности моноклональными антителами к протективному антигену <i>B. anthracis</i>)	1 пробирка (0,5 мл)
3. Пробирка № 2 (суспензия микросфер № 38 с иммобилизованными на их поверхности моноклональными антителами к летальному фактору <i>B. anthracis</i>)	1 пробирка (0,5 мл)
4. Пробирка № 3 (моноклональные антитела мыши к протективному антигену <i>B. anthracis</i> , конъюгированные с биотином)	1 пробирка (0,05 мл)
5. Пробирка № 4 (моноклональные антитела мыши к летальному фактору <i>B. anthracis</i> , конъюгированные с биотином)	1 пробирка (0,05 мл)
6. Пробирка № 5 (положительный контроль (K_1^+), жидкий – рекомбинантный протективный антиген <i>B. anthracis</i> , в концентрации 0,01 мг/мл)	1 пробирка (0,1 мл)
7. Пробирка № 6 (положительный контроль (K_2^+), жидкий – рекомбинантный летальный фактор <i>B. anthracis</i> , в концентрации 0,01 мг/мл)	1 пробирка (0,1 мл)
8. Пробирка № 7 (конъюгат стрептавидина с фикоэритрином, 500-кратный)	1 пробирка (0,01 мл)
9. ФСБ (фосфатно-солевой буфер (таблетки))	1 флакон (3 таблетки)
10. БСА (бычий сывороточный альбумин (сухая навеска))	1 флакон (2 г)
11. Пленка полимерная для заклеивания планшета	4 шт.

4. Аналитические и диагностические характеристики

4.1. Подлинность. При проведении анализа Тест-система ИФЛА-1Ва должна выявлять протективный антиген и летальный фактор возбудителя сибирской язвы.

4.2. Чувствительность. При проведении анализа тест-система обеспечивает определение протективного антигена и летального фактора возбудителя сибирской язвы каждого в концентрации не менее 1 пг/мл.

4.3. Специфичность. Перекрестная активность между моноклональными антителами к ПА и ЛФ отсутствует.

4.4. Диагностическая специфичность (доля правильных отрицательных результатов)- не менее 95 %, диагностическая чувствительность (доля правильных положительных результатов) при исследовании образцов с содержанием ПА и ЛФ в концентрации каждого 1 пг/мл и выше) – не менее 95 %.

5. Меры предосторожности.

Потенциальный риск применения тест-системы – класс 3 по ГОСТ Р 51609-2000. Приказ Минздрава РФ от 06.06.2012 г. №4н.

Работу проводят в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

При работе с тест-системой следует надевать одноразовые латексные перчатки, так как в компоненты тест-системы входит азид натрия, являющийся токсичным для человека.

Обеззараживание и уничтожение использованных наборов Тест-система ИФЛА-1Ва осуществляют в соответствии с СП 1.3.1285-03 путем автоклавирования в течение 60 мин при $126 \pm 2^\circ\text{C}$.

Утилизацию неиспользованных наборов с истекшим сроком годности проводят способом, предотвращающим повторное использование по назначению (сжиганием или автоклавированием).

6. Оборудование и материалы

6.1. Оборудование:

- проточный флуориметр Био-Плекс 200 в комплекте с управляющим компьютером;
- холодильник бытовой;
- шейкер орбитального типа;
- вортекс;
- магнитная мешалка;
- вошер с вакуумной программой для отмывки планшетов с фильтрующим дном;
- дозаторы автоматические с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 2-20, 50-200, 200-1000 мкл;
- дозатор автоматический многоканальный с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкости 50-300 мкл.

6.2. Материалы:

- фольга алюминиевая;
- бумага фильтровальная;
- стаканы химические мерные;
- пластиковые пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 мл;
- вода дистиллированная;
- магниты;
- этиловый спирт, хлорамин или перекись водорода для дезинфекции;
- перчатки одноразовые латексные

7. Способ применения.

Тест-система рассчитана на анализ в дубликатах 47 образцов.

7.1. При проведении анализа нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также нельзя использовать компоненты по истечении их срока годности.

7.2. Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре.

8. Приготовление рабочих растворов.

8.1. Для приготовления ФСБ (рН $7,4 \pm 0,1$) 1 таблетку ФСБ переносят в мерный стакан, доводят объем раствора до 100 мл дистиллированной водой и перемешивают.

8.2. Для приготовления раствора буфера для анализа (ФСБ с 1 % бычьего сывороточного альбумина) 2 таблетки ФСБ переносят в мерный стакан, добавляют навеску БСА, доводят объем раствора до 200 мл дистиллированной водой и перемешивают.

8.3. Для приготовления положительного контроля (K^+) делают смесь растворов ПА и ЛФ. Для этого в пластиковую пробирку вместимостью 1,5 мл вносят 900 мкл буфера для анализа и по 100 мкл растворов ПА (K_1^+) и ЛФ (K_2^+), после чего раствор тщательно перемешивают автоматическим дозатором.

8.4. Для приготовления рабочих растворов биотинилированных моноклональных анти-тел из пробирок с концентрированными биотинилированными МКА к протективному антигену и летальному фактору *B. anthracis* переносят в мерный стакан по 10 мкл и растворяют в 5 мл буфера для анализа.

8.5. Для приготовления рабочего раствора конъюгата стрептавидина с фикоэритрином содержимое флакона с концентрированным раствором конъюгата стрептавидина с фикоэритрином переносят в мерный стакан и доводят общий объем раствора до 5 мл буфером для анализа.

Примечание – Рабочий раствор конъюгата стрептавидина с фикоэритрином готовят непосредственно перед использованием.

9. Анализируемые образцы.

Сыворотка или плазма крови человека и животных, потенциально содержащие протективный антиген и летальный фактор экзотоксина *B. anthracis*.

9.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для проведения анализа используются образцы сыворотки или плазмы крови объемом не менее 150 мкл. Обеззараживание сывороток проводят в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Клинические образцы сывороток (плазмы) разводят 1:20 в ФСБ. Для этого смешивают 50 мкл каждой сыворотки с 950 мкл ФСБ.

Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность бактериального роста. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащих осадок и агрегаты, путем центрифугирования. Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериемией. Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов. Не допускать тестирования пула, содержащего несколько образцов сывороток.

Каждый образец сыворотки или раствора необходимо отбирать новым наконечником.

Хранят образцы не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С.

10. Проведение анализа.

10.1. Подготовить планшет с фильтрующим дном к анализу. Для этого в лунки планшета внести по 100 мкл буфера для анализа. Инкубировать планшет в течение 5 минут при комнатной температуре, а затем отобрать из лунок раствор с помощью вакуумной программы шпателя.

10.2. Подготовить суспензии микросфер. Для этого суспензии микросфер ресуспендировать, перемешав на вортексе. Суспензии микросфер объединить, перенести в мерный стакан. Стаканы ополоснуть 1 мл буфера для анализа, промывные воды объединить с суспензией микросфер и довести общий объем раствора до 5 мл буфером для анализа. Суспензию ресуспендировать с помощью вортекса в течение 30 с и сразу же разнести по лункам подготовленного планшета по 50 мкл на лунку.

10.3. Планшет 2 раза отмыть буфером для анализа с помощью вакуумной программы шпателя. После промывки необходимо осушить дно планшета с помощью фильтровальной бумаги.

10.4. Внести отрицательный контроль (100 мкл/лунку буфера для анализа), положительный контроль и исследуемые образцы в дубликатах в лунки подготовленного планшета с суспензиями микросфер согласно схеме (таблица 2).

Таблица 2 – Схема внесения образцов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K ⁻	X ₄	X ₈	X ₁₂	X ₁₆	X ₂₀	X ₂₄	X ₂₈	X ₃₂	X ₃₆	X ₄₀	X ₄₄
B	K ⁺	X ₄	X ₈	X ₁₂	X ₁₆	X ₂₀	X ₂₄	X ₂₈	X ₃₂	X ₃₆	X ₄₀	X ₄₄
C	X ₁	X ₅	X ₉	X ₁₃	X ₁₇	X ₂₁	X ₂₅	X ₂₉	X ₃₃	X ₃₇	X ₄₁	X ₄₅
D	X ₁	X ₅	X ₉	X ₁₃	X ₁₇	X ₂₁	X ₂₅	X ₂₉	X ₃₃	X ₃₇	X ₄₁	X ₄₅
E	X ₂	X ₆	X ₁₀	X ₁₄	X ₁₈	X ₂₂	X ₂₆	X ₃₀	X ₃₄	X ₃₈	X ₄₂	X ₄₆
F	X ₂	X ₆	X ₁₀	X ₁₄	X ₁₈	X ₂₂	X ₂₆	X ₃₀	X ₃₄	X ₃₈	X ₄₂	X ₄₆
G	X ₃	X ₇	X ₁₁	X ₁₅	X ₁₉	X ₂₃	X ₂₇	X ₃₁	X ₃₅	X ₃₉	X ₄₃	X ₄₇
H	X ₃	X ₇	X ₁₁	X ₁₅	X ₁₉	X ₂₃	X ₂₇	X ₃₁	X ₃₅	X ₃₉	X ₄₃	X ₄₇

Лунка A1 – отрицательный контроль (K⁻) – 100 мкл/лунку буфера для анализа;

Лунки B1 –положительный контроль K⁺ – 100 мкл/лунку;

Лунки C1-H12 – исследуемые образцы в дубликатах (X₁-X₄₇), 100 мкл/лунку.

10.5. Планшет заклеить пленкой, завернуть в алюминиевую фольгу, ресуспендировать микросферы с помощью шейкера при скорости вращения 1100 об/мин в течение 30 с и инкубировать на шейкере при комнатной температуре в течение 1 ч при скорости вращения 500 об/мин.

10.6. Включить анализатор и платформу для подачи планшета проточного флуориметра Био-Плекс 200. Затем включить компьютер. Для приведения прибора в рабочее состояние (прогрева лазеров) необходимо 30 минут. По истечении 30 минут запустить программу Bio-Plex Manager.

Примечание – Следует строго соблюдать порядок включения приборов: сначала – анализатор и платформу флуориметра, затем – компьютер.

Когда прибор будет готов к работе, провести процедуры Start Up (Пуск) и Calibration (Калибровка).

10.7. Создать протокол анализа, руководствуясь инструкцией к системе Био-Плекс. Для этого выбрать раздел New в меню File, будет открыто окно нового протокола с рядом подчиненных подокон. В подокне Describe protocol ввести описание тест-системы. В подокне Select Analytes, используя команду Create panel, ввести названия аналитов и соответствующие им номера микросфер (ПА *B. anthracis* – № 36, ЛФ *B. anthracis* – № 38), кнопкой Add перенести аналиты в список Selected (Выбранные). В подокне Format Plate задать формат планшета, руководствуясь схемой внесения образцов (рисунок 1). Для дубликатов следует вводить одинаковые имена. В подокне Enter Samples Info ввести информацию об исследуемых пробах.

10.8. Планшет 3 раза отмыть буфером для анализа с помощью вакуумной программы вошера. После промывки необходимо осушить дно планшета с помощью фильтровальной бумаги.

10.9. Во все лунки планшета внести по 50 мкл рабочего раствора биотинилированных моноклональных антител. Антитела вносить в лунки планшета в той же последовательности, что и образцы. Планшет заклеить пленкой, завернуть в алюминиевую фольгу, ресуспендировать микросферы с помощью шейкера при скорости вращения 1100 об/мин в течение 30 с, затем инкубировать при скорости вращения 500 об/мин при комнатной температуре в течение 30 мин.

10.10. Планшет 3 раза отмыть буфером для анализа с помощью вакуумной программы вошера. После промывки необходимо осушить дно планшета с помощью фильтровальной бумаги.

10.11. Во все лунки планшета внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата стрептавидина с фикоэритрином в той же последовательности, что и биотинилированные антитела. Планшет заклеить пленкой, завернуть в алюминиевую фольгу, ресуспендировать микросферы с помощью шейкера при скорости вращения 1100 об/мин в течение 30 с, затем инкубировать при скорости вращения 500 об/мин при комнатной температуре в течение 30 мин.

10.12. Планшет 3 раза отмыть буфером для анализа с помощью вакуумной программы вошера. После промывки необходимо осушить дно планшета с помощью фильтровальной бумаги.

10.13. Во все лунки планшета внести по 125 мкл раствора буфера для анализа.

10.14. Планшет заклеить пленкой и в течение 30 с перемешать содержимое лунок с помощью шейкера при скорости вращения 1100 об/мин.

Примечание – На каждом этапе анализа необходимо использовать новую пленку для заклеивания планшета.

10.15. Щелкнуть кнопку Run Protocol, в открывшемся окне еще раз проверить все параметры протокола и щелкнуть кнопку Start. Загрузить планшет с суспензиями микросфер в платформу, предварительно сняв с него пленку. Произвести учет результатов, щелкнув кнопку ОК. Вычисление средних арифметических значений интенсивности флуоресценции фикоэритрина и определение наличия специфических антигенов *B. anthracis* в анализируемых образцах происходит автоматически.

11. Оценка результатов.

Результаты считаются достоверными только в том случае, если величина интенсивности флуоресценции (ед.инт.) в лунке с положительным контролем (K+) не менее 100 ед.инт.

Разница значения сигнала между отрицательным и положительным контролями должна быть не менее 40 ед.инт.

Положительным считается образец со значением сигнала, не менее чем на 5 единиц превышающим значение сигнала в лунке с отрицательным контролем K⁻.

Если данные критерии в отношении положительного и отрицательного контролей не соблюдены, то анализ считается недействительным и его необходимо повторить.

12. Условия хранения и эксплуатации.

12.1. Набор реагентов следует хранить в закрытой упаковке в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

12.2. Рабочие растворы ФСБ буфера для анализа, биотинилированных антител, конъюгата стрептавидина с фикоэритрином хранят при температуре 2-8 °С в закрытых емкостях не более 7 дней.

12.3. Тест-систему транспортируют всеми видами крытого транспорта в контейнерах при соблюдении условий хранения или при температуре от 2 до 25 °С не более 7 суток. Замораживание компонентов тест-системы не допускается.

13. Указания к применению.

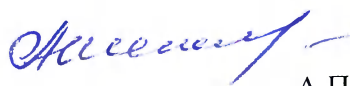
Набор реагентов для одновременного определения протективного антигена и летально-го фактора возбудителя сибирской язвы методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа (Тест-система ИФЛА-1Ва) используется в соответствии с Инструкцией по применению, утвержденной в установленном порядке.

14. Срок годности.

Срок годности Тест-системы ИФЛА-1Ва – 6 месяцев.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов для одновременного определения протективного антигена и летального фактора возбудителя сибирской язвы методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа (Тест-система ИФЛА-1Ва) в течение срока годности следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, Оболенск, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 31-19-15, 36-01-16

Зам. директора ФБУН ГНЦ ПМБ
по научно-производственной работе



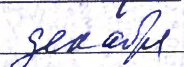
А.П. Шепелин

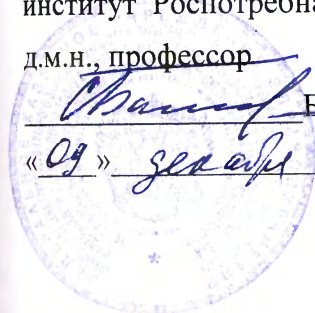
«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

д.м.н., профессор

 Балахонов С.В.

« 09 »  2013 г.



Пронумеровано, прошнуровано,
скреплено подписью и печатью

81 восемь

листов. Подпись

" 09 " 12 2013

И. Аверина

