

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

от _____ 200_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
антигена вируса

Крымской-Конго геморрагической лихорадки

«ВектоКрым-КГЛ-антиген»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для выявления вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в клещах и других вирусосодержащих материалах (культуральной жидкости, секционном материале) методом иммуноферментного анализа и может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях.

1.2. Набор реагентов не предназначен для исследования сыворотки и плазмы крови человека и животных.

1.3. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

Принцип метода заключается во взаимодействии антигена К-КГЛ из исследуемого материала с антителами, иммобилизованными в лунках полистиролового планшета. Связавшийся антиген выявляют с помощью анти-К-КГЛ-антител, меченных пероксидазой хрена (конъюгат). По завершении постановки теста развивается окрашивание, свидетельствующее о присутствии антигена К-КГЛ в образце (хромогеном является тетраметилбензидин). Степень окраски пропорциональна концентрации антигена К-КГЛ в анализируемых образцах.

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором НИИ СД М.П. Гришаевым, научным сотрудником НИИ СД О.А. Шваревой.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения $ОП_{крит}$ анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицательные

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный с иммобилизованными поликлональными антителами к вирусу Крымской-Конго геморрагической лихорадки (К-КГЛ) – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) – буферный раствор, содержащий инактивированный антиген вируса К-КГЛ – прозрачная красного цвета жидкость – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец (K^-) – буферный раствор, не содержащий антиген вируса К-КГЛ – прозрачная бесцветная или бледно-жёлтого цвета жидкость – 1 фл., 3,0 мл;
- конъюгат – поликлональные антитела к К-КГЛ, меченные пероксидазой хрена, концентрат – жидкость синего цвета – 1 фл., 1,5 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при нагревании до (30-40) °С – 1 фл., 28 мл;
- раствор для разведения образцов (РРО) – прозрачная бесцветная или бледно-желтого цвета жидкость – 2 фл. по 25 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РРК) – прозрачная бесцветная или бледно-желтого цвета жидкость – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 1,0 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент – раствор серной кислоты, 0,5 моль/л – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 12 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 4-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность набора, определенная по образцам стандартной панели предприятия, содержащих антиген вируса К-КГЛ (СПП 05-2-231), составляет 100 %.

3.2. Специфичность набора, определенная по образцам стандартной панели предприятия, не содержащих антиген вируса К-КГЛ (СПП 05-2-231), составляет 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000, приказ Минздравсоцразвития России №735 от 30 октября 2006 г.).

Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 месяца с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности набора.

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

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

– Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 650 нм;

– термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °С;

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл;

– промывочное устройство для планшета;

– перчатки резиновые хирургические;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Приготовление суспензий клещей:

– Клеща обмыть 70% раствором этилового спирта, затем физиологическим раствором с антибиотиками (1000 ед. пенициллина и 500 мг стрептомицина на 1 мл среды). Поместить в пробирки типа «Эппендорф» по 1 экземпляру и плотно закрыть.

Допускается хранение клещей до 3 месяцев при температуре не выше -18°C .

– Пробирку с клещом поместить в емкость с жидким азотом и заморозить в течение 20 мин.

– Замороженного клеща осторожно и тщательно растереть в гомогенизаторе или в пробирке стеклянной или металлической палочкой (диаметр палочки должен строго соответствовать диаметру дна пробирки).

При многократном использовании палочек, их следует выдержать в течение 30 мин в 70% растворе этилового спирта, затем промыть дистиллированной водой и высушить.

– В гомогенизатор или в пробирку с растертым клещом добавить 200 мкл раствора для разведения образцов. Тщательно перемешать до получения однородной суспензии.

– Для напивавшихся клещей РРО добавляют 0,5 мл РРО на одного клеща.

– Суспензии центрифугировать в течение 5 мин при 2000 об/мин. Полученные супернатанты использовать для анализа.

Возможно хранение супернатанта не более суток при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$.

6.2. Приготовление суспензии секционного материала:

– Кусочки секционного материала (головной мозг, печень, селезенка, лимфатические узлы) растереть в фарфоровой ступке пестиком и добавить небольшое количество стеклянного песка. Добавить 4 мл раствора для разведения образцов на 1 г секционного материала. Суспензии центрифугировать в течение 5 мин при 2000 об/мин. Полученные супернатанты использовать для анализа.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

7.1. *Внимание!* Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

– Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

– Сразу после постановки реакции неиспользованный планшет и плотно закрытые флаконы с исходными компонентами необходимо поместить в холодильник, поддерживающий температуру от 2 до 8°C .

– При промывке лунки (*стрипа, планшета*) заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через края лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 с.

– При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть заметного роста микроорганизмов. Раз в неделю ёмкость для промывочного раствора и шланги следует промывать 70 % спиртом.

– Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями.

– При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

– В случае повторного использования посуду (ванночки) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ сразу после работы промыть 50 % раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

– Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе четвертичных аммониевых соединений, спиртов, третичных аминов.

– Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70 % раствором этилового спирта. Не использовать во время проведения ИФА перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов.

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °C в течение 30 мин.

7.2.1. Подготовка планшета.

Непосредственно перед использованием вскрыть пакет с планшетом со стороны замка, отступив примерно 1 см. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов; остальные стрипы снять с рамки и немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Неиспользованные стрипы после первого вскрытия пакета можно хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение 1 месяца.

7.2.2. Приготовление контрольных образцов (K^+ , K^-).

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

7.2.3. Приготовление раствора для отмывки планшета.

В соответствии с числом стрипов (см. таблицу расхода реагентов) в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл внести необходимое количество концентрата ФСБ-Т×25 и довести до необходимого объема дистиллированной водой, тщательно перемешать до полного растворения. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре

(30-40) °С до полного растворения осадка.

Приготовленный раствор для отмывки планшета можно хранить при температуре от 2 до 8 °С до 3 суток.

7.2.4. Приготовление раствора конъюгата.

Раствор конъюгата готовить непосредственно перед использованием. В соответствии с числом стрипов (см. таблицу расхода реагентов) в ванночку для реагента внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Приготовленный раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25 °С до 3 ч.

Таблица расхода реагентов

Количество одновременно используемых стрипов	Раствор конъюгата		Раствор тетраметилбензидаина		Раствор для промывки планшета	
	Концентрат конъюгата, мл	РРК, мл	Концентрат ТМБ, мкл	СБР, мл	Концентрат ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл
1	0,1	1,0	70	1,0	2,0	до 50
2	0,2	2,0	140	2,0	4,0	до 100
3	0,3	3,0	210	3,0	6,0	до 150
4	0,4	4,0	280	4,0	8,0	до 200
5	0,5	5,0	350	5,0	10,0	до 250
6	0,6	6,0	420	6,0	12,0	до 300
7	0,7	7,0	490	7,0	14,0	до 350
8	0,8	8,0	560	8,0	16,0	до 400
9	0,9	9,0	630	9,0	18,0	до 450
10	1,0	10,0	700	10,0	20,0	до 500
11	1,1	11,0	770	11,0	22,0	до 550
12	1,2	12,0	840	12,0	24,0	до 600

7.2.5. Приготовление раствора тетраметилбензидаина

Раствор тетраметилбензидаина готовить непосредственно перед использованием. В соответствии с числом стрипов (см. таблицу расхода реагентов) в ванночку для реагента внести необходимое количество субстратного буферного раствора, добавить соответствующее количество концентрата тетраметилбензидаина, тщательно перемешать.

Приготовленный раствор стабилен до 3 ч в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С.

Внимание! В набор вложены ванночка для реагентов и наконечники для пипетки, которые следует использовать только для работы с раствором тетраметилбензидаина. Посуду и пипетки (наконечники), контактирующие с раствором тетраметилбензидаина,

нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следовые количества ведут к неконтролируемому разложению тетраметилбензидина в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% раствором этилового спирта и тщательно отмыть дистиллированной водой.

7.3. Проведение анализа

7.3.1. В лунку А-1 внести 100 мкл раствора для разведения образцов (РРО). Лунка А-1 будет являться контролем поглощения субстратного буферного раствора с тетраметилбензидином.

В лунки стрипов внести по 100 мкл положительных и отрицательных контрольных образцов (K^+ , K^-) по следующей схеме:

при использовании 1 стрипа – 1 лунка K^+ и 2 лунки K^-

2 стрипов – 2 лунки K^+ и 2 лунки K^-

3 стрипов и более стрипов – 2 лунки K^+ и 3 лунки K^-

Согласно схеме в лунки стрипа, например, В-1, С-1, внести по 100 мкл K^- . В лунки D-1, E-1 внести по 100 мкл K^+ .

В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых образцов, тщательно перемешать.

7.3.2. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 60 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.3.3. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть 5 раз, добавляя во все лунки по 350 мкл раствора для отмывки планшета (см. п. 7.2.3). Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Раствор из лунок тщательно удалить, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.3.4. Внести во все лунки, кроме А-1, по 100 мкл раствора конъюгата (п. 7.2.4). В лунку А-1 внести 100 мкл раствора для разведения конъюгата.

Для внесения раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в комплектацию.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать 60 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.3.5. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть 5 раз промывочным раствором так, как указано в п. 7.3.3.

7.3.6. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см. п. 7.2.5).

Планшет заклеить пленкой и выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 $^\circ\text{C}$.

7.3.7. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента.

В случае попадания на кожу раствора тетраметилбензидина или стоп-реактанта необходимо немедленно смыть их водой с мылом.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620-650 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень (бланк) осуществлять по воздуху).

Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,2$$

где: $ОП_{ср}(K^-)$ – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.2. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом $ОП_{ср}(K^-)$ не должно превышать 0,25 ед. опт. плотн.

Среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с положительным контрольным образцом ($ОП_{ср} K^+$) должно быть не менее 1,0 ед. опт. плотн.

Значение оптической плотности в лунке контроля поглощения субстратного буферного раствора с тетраметилбензидином должно быть не более 0,10 ед. опт. плотн.

9.3. Результат анализа считают положительным, если $ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$;

результат анализа считают сомнительным, если $0,8 \times ОП_{крит} < ОП_{обр} < ОП_{крит}$;

результат анализа считают отрицательным, если $ОП_{обр} \leq 0,8 \times ОП_{крит}$;

где $ОП_{обр}$ – оптическая плотность в лунке с исследуемым образцом.

Если $ОП_{обр}$ попадает в интервал от $0,8 \times ОП_{крит} < ОП_{обр} < ОП_{крит}$, то результат анализа сомнительный. Рекомендуется повторить анализ такого образца.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора – при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя – при температуре от 2 до 8 °С.