

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

от _____ 200_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

12 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса М к вирусу
Крымской-Конго геморрагической лихорадки
«ВектоКрым-КГЛ-IgM»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу Крымской-Конго геморрагической лихорадки (К-КГЛ) в сыворотке (плазме) крови человека методом «захвата» иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

В лунках полистироловых планшетов иммобилизованы моноклональные антитела к IgM человека. Во время первой инкубации, при внесении в лунки планшета исследуемого образца происходит связывание присутствующих в нем иммуноглобулинов класса М с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к IgM человека. После удаления промыванием несвязавшихся компонентов сыворотки, в лунки планшета вносят смесь конъюгата и антигена К-КГЛ. Во время второй инкубации, связавшиеся специфические IgM взаимодействуют с антигеном К-КГЛ, находящемся в комплексе с пероксидазным конъюгатом.

После удаления несвязавшихся компонентов реакции, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина (хромоген) и перекисью водорода (субстрат пероксидазы), происходит

11

окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации IgM к 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.

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 моноклональными антителами к IgM человека – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащей IgM к К-КГЛ – прозрачная красного цвета жидкость – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащей IgM к К-КГЛ – прозрачная бесцветная или бледно-жёлтого цвета жидкость – 1 флакон (3,0 мл);
- антиген вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, инактивированный, концентрат – прозрачная жидкость желтого цвета – 1 флакон (1,5 мл);
- конъюгат – поликлональные мышиные антитела к К-КГЛ, меченные пероксидазой хрена, концентрат – прозрачная жидкость синего цвета – 1 флакон (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 – 2 флакона (по 28 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – прозрачная жидкость малинового цвета – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения конъюгата (РПК) – прозрачная бесцветная или бледно-жёлтого цвета жидкость – 1 флакон (13 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – прозрачная бесцветная или бледно-жёлтого цвета жидкость – 1 флакон (12 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – прозрачная бесцветная или бледно-желтого цвета жидкость – 1 флакон (1,0 мл);

- субстратный буферный раствор (СБР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент – раствор серной кислоты, 0,5 моль/л – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- планшетом для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.;
- 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, определённая по сывороткам стандартной панели предприятия, содержащих IgM к вирусу К-КГЛ (СПП 05-2-230), составляет 100 %.

3.2. Специфичность набора, определённая по сывороткам стандартной панели предприятия, не содержащих IgM к вирусу К-КГЛ (СПП 05-2-230), 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, РПРС, 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 °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

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток, а также хранившихся при минус 20 °С не более 3 мес.

Образцы, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 5 мин при 5000 - 10000 об/мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гинерлипидные образцы или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

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 объёмов 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 °С.

–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 °С 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 °С 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. Подготовка исследуемых образцов.

Исследуемые сыворотки развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток. Для этого, используя планшет для предварительного разведения образцов, к 90 мкл РПРС добавить 10 мкл цельной сыворотки, тщательно перемешать. При этом цвет раствора должен измениться с малинового на желтый. Если изменения не произошло, сыворотка для анализа не годится.

Приготовленные 10-тикратно разведенные сыворотки можно хранить до 3 часов при температуре от 18 до 25 °С.

7.2.4. 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.

7.2.5. Приготовление смеси антигена К-КГЛ и конъюгата.

Смесь антигена К-КГЛ и 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 и концентрата антигена К-КГЛ, тщательно перемешать.

Приготовленную смесь антигена К-КГЛ и 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	антиген К-КГЛ, мл	РРК, мл	Концентрат ТМБ, мкл	СБР, мл	Концентрат ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл
1	0,1	0,1	1,0	70	1,0	2,0	до 50
2	0,2	0,2	2,0	140	2,0	4,0	до 100
3	0,3	0,3	3,0	210	3,0	6,0	до 150
4	0,4	0,4	4,0	280	4,0	8,0	до 200
5	0,5	0,5	5,0	350	5,0	10,0	до 250
6	0,6	0,6	6,0	420	6,0	12,0	до 300
7	0,7	0,7	7,0	490	7,0	14,0	до 350
8	0,8	0,8	8,0	560	8,0	16,0	до 400
9	0,9	0,9	9,0	630	9,0	18,0	до 450
10	1,0	1,0	10,0	700	10,0	20,0	до 500
11	1,1	1,1	11,0	770	11,0	22,0	до 550
12	1,2	1,2	12,0	840	12,0	24,0	до 600

7.2.6. 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 тетраметилбензидина. Посуду и пипетки (наконечники), контактирующие с раствором тетраметилбензидина, 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.

7.2.7. Подготовка раствора для разведения сывороток.

Перед использованием тщательно взболтать содержимое флакона с раствором для разведения сывороток.

7.3. Проведение анализа.

Внимание! Внесение контрольных и исследуемых образцов проводить достаточно быстро, в течение 5-7 мин, так как при длительном времени внесения образцов в лунки планшета время инкубации первого и последнего образцов значительно отличаются, что может привести к неправильной оценке результатов.

7.3.1. В лунку А-1 внести 100 мкл раствора для разведения сывороток (п. 7.2.7.). 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 Д-1, Е-1 внести по 100 мкл K^+ .

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток (п. 7.2.3.), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 100 раз.

7.3.2. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 1 ч 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. 7.2.4.). 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 смеси антигена К-КГЛ и конъюгата (п. 7.2.5.). В лунку А-1 внести 100 мкл раствора для разведения конъюгата.

Для внесения смеси антигена К-КГЛ и конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в комплектацию.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать 90 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. 7.2.6.).

Планшет заклеить пленкой и выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

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

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 с контролем раствора тетраметилбензидина 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 $ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$, то результат анализа исследуемого образца считают положительным, причем необходимо проведение повторного анализа таких сывороток для исключения ложноположительных результатов, обусловленных случайными, несистемными ошибками

при постановке анализа.

Если $ОП_{обр}$ попадает в интервал от $0,8 \times ОП_{крит}$ до $ОП_{крит}$, то результат анализа сомнительный. Рекомендуется повторить анализ такой сыворотки. При повторном сомнительном результате необходимо проанализировать сыворотку, полученную через 3–5 дней, параллельно с 1-м образцом сыворотки, на наличие IgM и IgG для выявления сероконверсии и подтверждения факта инфицирования вирусом К-КГЛ.

Если $ОП_{обр} \leq 0,8 \times ОП_{крит}$, то результат анализа считают отрицательным, IgM к вирусу К-КГЛ не определены. Но это не означает, что пациент не инфицирован вирусом К-КГЛ. Если кровь взята у больного в начале острой фазы заболевания, IgM в сыворотке крови могут отсутствовать, поэтому при подозрении на наличие инфекции (клинические проявления) рекомендуется исследовать сыворотку, взятую у пациента через 3–5 дней, на наличие IgM повторно.

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 компонентов набора не допускается.

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

10.3. Срок годности – 9 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

По вопросам, касающимся качества набора обращаться:

в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу: 630559, п. Кольцово, Новосибирской обл, Новосибирского района, а/я 121, тел. (383) 336-92-49, 227-60-30, 227-67-64, тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44, 336-73-46.

E:mail: vbobtk@vector-best.ru

Научный сотрудник лаборатории
герпес-вирусных инфекций
ЗАО «Вектор-Бест»

О.А. Шварёва

Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.П. Гришаев

Директор ГУ ЦИВ РАМН,
академик



Д.К. Львов