

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2007 г. № _____

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

«Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

_____ 2007 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита
(ВектоВКЭ - IgG)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВектоВКЭ - IgG (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Активными компонентами набора являются антиген ВКЭ, иммобилизованный в лунках планшетов, конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, положительный и отрицательный контрольные образцы.

В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца во время первой инкубации происходит связывание иммуноглобулинов класса G к ВКЭ с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном. На поверхности лунок образуется комплекс «антиген-антитело». После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и добавления в лунки планшета конъюгата происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс.

В результате ферментативной реакции, проведенной в лунках, отмытых от избытка конъюгата, с тетраметилбензидином образуется окрашенный продукт, интенсивность окра-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИСД М.Ю. Рукавишниковым и зав. лабораторией И.Н. Кувишиновой

ски которого пропорциональна концентрации IgG к ВКЭ в анализируемом образце. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента.

2.2. Состав набора

В состав набора входят следующие реагенты:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ) с антигеном ВКЭ, готовый для использования – 1 шт.;
- K^+ , положительный контрольный образец – иммуноглобулины класса G (IgG) к ВКЭ, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- K^- , отрицательный контрольный образец – инактивированная сыворотка крови, не содержащая IgG к ВКЭ, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат, концентрат – 1 флакон (1,5 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения сывороток – 1 флакон (12 мл);
- раствор для разведения конъюгата – 1 флакон (12 мл);
- субстратный буферный раствор – 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент (1 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется пленкой для заклеивания планшета, ванночкой для реагентов и наконечниками для пипетки на 4–200 мкл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфическая активность

Набор выявляет IgG к вирусу клещевого энцефалита в положительном стандартном образце предприятия (СОП+) и положительном контрольном образце (K^+) – чувствительность 100%; и не выявляет в отрицательной стандартной панели предприятия (СПП–) и отрицательном контрольном образце (K^-) – специфичность 100%. Оптическая плотность в лунках с СОП+ не менее 1,5; K^+ – не менее 0,8; K^- – не более 0,2. Титр IgG к ВКЭ в СОП+ – не менее 1:16.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными. Раствор серной кислоты 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.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как исследуемые образцы сывороток крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом (основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620-650 нм) или одноволновом (на длине волны 450 нм) режимах;
- термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °С;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл;
- промыватель ручной восьмиканальный ПР-8;
- отсасыватель медицинский В-40А;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100, 1000 мл;
- вода дистиллированная;

– 6% раствор перекиси водорода.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для выявления иммуноглобулинов класса G к ВКЭ возможно использование сыворотки (плазмы) крови как свежеприготовленной, так и хранившейся при температуре (2 – 8) °С в течение 24 ч, либо замороженной при минус 20 °С в течение 3 месяцев.

Сыворотки, содержащие осадок, могут дать ложный результат, поэтому перед анализом они должны быть очищены центрифугированием при 5 – 10 тыс.об./мин.

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

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы подвергать обработке 6 % раствором перекиси водорода (не менее 6 час).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при комнатной температуре не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета.

Непосредственно перед использованием вскрыть пакет с планшетом выше замка. 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 мес.

7.3. Подготовка контрольных образцов K^+ и K^- .

Положительный и отрицательный контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

После первого вскрытия флаконы с контрольными образцами можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес.

7.4. Приготовление рабочего промывочного раствора.

Количество рабочего промывочного раствора, необходимое для данной постановки анализа, определяют, в зависимости от числа используемых стрипов, по таблице расхода реагентов (см таблицу).

Отобрать необходимое количество 25-кратного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином из флакона, довести до соответствующего объема дистиллированной водой и тщательно перемешать. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30-40 °С до полного растворения осадка.

Рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут.

7.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Готовить за 5-10 мин до окончания первой инкубации!

Количество рабочего раствора конъюгата, необходимое для данной постановки анализа, определяют, в зависимости от числа используемых стрипов, по таблице расхода реагентов (см таблицу).

В чистый флакон (пластиковую емкость) перенести необходимое количество раствора для разведения конъюгата, добавить соответствующий объем концентрата конъюгата и тщательно перемешать.

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре (от 18 до 25°С) не более 30 мин.

7.6. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

Готовить за 5-10 мин до окончания второй инкубации! Следует исключить воздействие света на раствор тетраметилбензидина, например, обернуть флакон фольгой.

Количество рабочего раствора ТМБ, необходимое для данной постановки анализа, определяют в зависимости от числа используемых стрипов по таблице расхода реагентов (см таблицу).

В чистый флакон перенести необходимое количество субстратного буферного раствора, добавить соответствующий объем концентрата тетраметилбензидина и тщательно перемешать. Приготовленный рабочий раствор тетраметилбензидина должен быть прозрачным и бесцветным.

Рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) не более 3 ч.

Внимание! Для работы с раствором ТМБ рекомендуется выделить отдельную посуду и отдельные наконечники для пипетки. Посуду и пипетки (наконечники), контактирующие с раствором ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств,

поскольку даже их следовые количества ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% раствором этилового спирта и тщательно отмыть дистиллированной водой.

7.7. Подготовка исследуемых образцов сывороток.

Исследуемые образцы развести раствором для предварительного разведения сывороток в 10 раз. Для этого во вспомогательный ряд пробирок или в лунки вспомогательного планшета внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток и добавить по 10 мкл исходной исследуемой сыворотки, тщательно перемешать. Цвет раствора должен измениться с малинового на жёлтый. Если изменение цвета не произошло, данную сыворотку для проведения анализа не годится.

Внимание! Разведенные сыворотки хранению не подлежат!

Таблица расхода реагентов

Количество одновременно используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор ТМБ		Рабочий промывочный раствор	
	Концентрат конъюгата, мл	РРК, мл	Концентрат ТМБ, мкл	СБР, мл	25-кратный концентрат ФСБТ, мл	Вода дистиллированная, 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

7.8. В лунки стрипа, например, А-1, В-1, С-1 внести по 100 мкл K^- . В лунки стрипа, например, D-1 и E-1 – по 100 мкл K^+ . В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведённых исследуемых сывороток (п. 7.7.). Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 100 раз.

Если необходимо определить титр IgG к ВКЭ в выявленных ранее положительных образцах, проводят титрование исследуемых образцов. Для титрования положительных сывороток используют вертикальные ряды планшета.

В лунки верхнего ряда А-2 – А-12 вносят по 180 мкл раствора для разведения сыворо-

ток и по 20 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п.8.7.), тщательно перемешивают. Во все оставшиеся лунки вносят по 100 мкл раствора для разведения сывороток. Выполняют титрование положительных образцов, для чего по 100 мкл из лунок А-2 – А-12 последовательно переносят в лунки соответствующих вертикальных рядов, тщательно перемешивая пипетированием после каждого переноса. После чего по 100 мкл содержимого лунок Н-2 – Н-12 сбрасывают в сосуд с дезинфицирующим раствором. Таким образом, в лунках вертикальных рядов 2 – 12 получают последовательные двукратные разведения исследуемых образцов (от 1:100 до 1:12800).

Планшет заклеить липкой пленкой и инкубировать во влажной камере в течение 60 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.9. По окончании инкубации снять пленку и поместить в сосуд с дезинфицирующим раствором, содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором (6% раствор перекиси водорода) и промыть, добавляя во все лунки не менее 350 мкл рабочего промывочного раствора (см п. 7.4.). Процесс промывки повторить 5 раз. Необходимо проводить контроль полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки. Отработанный рабочий промывочный раствор также удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.10. Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п.7.5.).

Планшет заклеить липкой пленкой и инкубировать во влажной камере в течение 60 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.11. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшеты 6 раз рабочим промывочным раствором и 2 раза дистиллированной водой так, как указано в п. 7.9.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (п. 7.6.).

Планшет заклеить липкой пленкой и выдержать в защищенном от света месте в течение 20-25 мин при комнатной температуре (от 18 до 25 $^\circ\text{C}$).

7.13. Остановить ферментативную реакцию: внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

Внимание! Стоп-реагент представляет собой раствор серной кислоты. В случае попадания на кожу и слизистые оболочки раствора ТМБ или стоп-реагента необходимо немедленно смыть их большим количеством проточной воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620-650 нм. Допускается измерение оптической плотности на одной длине волны - 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень (бланк) осуществлять по воздуху. Измерение проводить сразу после внесения стоп-реагента.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать средние значения оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным и положительным контрольными образцами ($ОП_{ср}K^-$, $ОП_{ср}K^+$).

Результаты исследований учитывают только при соблюдении следующих условий:

– среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср} K^-$) не более 0,2;

– среднее значение ОП в лунках с положительным контрольным образцом ($ОП_{ср} K^+$) не менее 0,8.

9.2. Для оценки результатов анализа вычислить контрольный уровень оптической плотности ($ОП_{крит}$) по следующей формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}K^- + 0,1$$

9.3. Результат анализа считают положительным, если значение ОП в соответствующей лунке с исследуемым образцом равно или превышает величину $ОП_{крит}$.

Результат анализа считают отрицательным, если значение ОП в соответствующей лунке с исследуемым образцом ниже $ОП_{крит}$.

За титр IgG к ВКЭ принимают наибольшее разведение исследуемого образца, при котором ОП в соответствующей лунке превышает $ОП_{крит}$.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Набор ВектоВКЭ - IgG должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (9 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора:

– стрипы использовать в течение 1 мес после вскрытия упаковки;

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор для

разведения сывороток и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут;

– концентраты тетраметилбензидина и конъюгата после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес;

– рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) не более 30 мин;

– рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре не более 3 ч;

– разведенные исследуемые сыворотки хранению не подлежат.

10.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

10.4. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

10.5. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора ВектоВКЭ - IgG, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,

тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52,

и в Федеральное государственное учреждение науки «Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича» Роспотребнадзора по адресу:

121002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел. (495) 241-39-22.

Зам. директор НИИСД

ЗАО «Вектор-Бест»

Зав. лабораторией

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

И.Н. Кувшинова