

Приказом Росздравнадзора
от _____ 201__ г. № _____

Первый заместитель
генерального директора
ФГУП «НПО «Микроген»
Минздрава России
П.В. Смачков
_____ 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ по применению набора реагентов

Тест-система иммуноферментная для определения антител к ортопоксвирусам

Набор реагентов Тест-система иммуноферментная для определения антител к ортопоксвирусам включает следующие реагенты для проведения иммуноферментного анализа:

1. **Иммуносорбент** – монолитный полистироловый 96-луночный планшет для ИФА с прозрачными бесцветными лунками, на поверхности которых сорбированы антигены: в лунках нечетных рядов планшета – вирусный антиген (лизат клеточных культур, инфицированных вирусом осповакцины, A^+), в лунках четных рядов планшета – контрольный антиген (лизат тех же клеточных культур, не инфицированных вирусом осповакцины, A^-).

2. **K^+ - положительный контрольный образец** – сыворотка донорской крови человека, инактивированная, содержащая антитела к вирусу осповакцины, сухая. Не содержит HBsAg и антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, к возбудителю сифилиса. Лиофилизированная масса белого, светло-кремового или светло-желтого цвета.

3. **K^- - отрицательный контрольный образец** – сыворотка донорской крови человека, инактивированная, не содержащая антитела к вирусу осповакцины, сухая. Не содержит HBsAg и антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, к возбудителю сифилиса. Лиофилизированная масса белого, светло-кремового или светло-желтого цвета.

4. **K - конъюгат** - антитела диагностические против иммуноглобулинов человека, меченные пероксидазой хрена. Лиофилизированная масса белого, светло-кремового или светло-желтого цвета.

5. **ТМБ** - концентрат тетраметилбензидина – хромоген. Прозрачная бесцветная жидкость.

6. **БСА (бычий сывороточный альбумин)** – стабилизатор. Аморфный порошок белого или светло-серого, или светло-желтого цвета, гигроскопичен.

7. ФСБ-Т_{х25} - концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с Твином-20 – для приготовления рабочих растворов. Прозрачная или слабо опалесцирующая бесцветная жидкость, в которой допускается выпадение кристаллов солей, растворимых в течение 20-30 мин при температуре раствора (37±1) °С.

8. ЦБР – цитратный буферный раствор с добавлением водорода перекиси – для приготовления раствора хромогена. Прозрачная бесцветная жидкость.

9. Стоп-реагент – 2,2 М раствор кислоты серной. Прозрачная бесцветная жидкость

Принцип метода: набор должен давать в ИФА положительную реакцию с K^+ и отрицательную - с K^- при использовании реагентов набора в их рабочих разведениях и значении оптической плотности (ОП) в лунках контроля конъюгата не выше 0,2.

Набор рассчитан на исследование 86 проб (86 анализов) и проведение контрольных опытов с K^+ , K^- , K .

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для определения антител к ортопоксвирусам» предназначен для определения антител к ортопоксвирусам в сыворотках крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Область применения – лабораторная диагностика ортопоксвирусов, эпидемиологические исследования.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Оборудование, материалы и реагенты (не включенные в состав набора), необходимые для проведения анализа:

- дозаторы (пипетки) переменного объема (механические или электронные): 8- или 12-канальные с объемом дозирования от 5 до 200 мкл и 1- канальные с объемом дозирования от 10 (20) до 100 (200) мкл, от 100 до 1000 мкл и от 1 до 5 (10) мкл;
- наконечники, соответствующие дозаторам;
- стаканы химические мерные или колбы мерные вместимостью 100 мл;
- пипетки стеклянные градуированные 2-го класса точности вместимостью 10; 5; 2; 1 мл;
- группа резиновая;
- термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;
- холодильник бытовой (любого типа);
- часы (любого типа);
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- вода очищенная;
- прибор для учета результатов реакции (фотометр);

- дезинфицирующий раствор: 3 % раствор водорода перекиси или 3 % раствор хлорамина.

Вся посуда, используемая для постановки реакции, должна быть химически чистой и не содержать ионов тяжелых металлов. Следует избегать непосредственной близости с хлорсодержащими дезинфектантами, особенно на этапах приготовления ТМБ. Для отбора исследуемых образцов и реагентов тест-системы необходимо использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5 %. Отбор реагентов следует производить чистыми наконечниками для автоматических пипеток.

2. Меры предосторожности

В состав набора входит реагент (иммуносорбент), содержащий вирус осповакцины, который относится к IV группе патогенности и может инфицировать персонал в процессе анализа. Кроме того, опасность представляет исследуемый материал (сыворотка крови человека), который может содержать ортопоксвирусы, а также возможно присутствие вирусов инфекционных гепатитов В и С, вирусов иммунодефицита человека. Поэтому, в целях предупреждения распространения инфекции внутри лаборатории, необходимо соблюдать санитарно-гигиенические правила безопасной работы в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», «Инструкции по противозидемическому режиму в лабораториях диагностики СПИД» № 42-28/38-90 от 5 июля 1990 г., Приказом № 408 от 12.07.1989 г «О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в стране»:

- работать в резиновых перчатках;
- использовать автоматические пипетки (дозаторы) с одноразовыми пластиковыми наконечниками;
- все использованные материалы, сточные растворы, одноразовую лабораторную посуду перед утилизацией подвергать обработке дезинфицирующим раствором (3 % раствор водорода перекиси или 3 % раствор хлорамина в течение 4 ч) или автоклавированием при давлении пара 0,2 МПа, температуре 132 °С в течение 45 мин;
- оборудование, находившееся в контакте с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать 70 % этиловым спиртом.

При попадании на кожу стоп-реагента или ТМБ следует немедленно смыть их обильным количеством воды и вымыть с мылом место контакта.

Утилизацию иммуносорбента из наборов с истекшим сроком годности проводят после обеззараживания согласно СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» автоклавированием при давлении пара 0,2 МПа, температуре $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 45 мин.

3. Подготовка исследуемого материала

3.1. Получение сыворотки для исследований

Взятую в пробирки кровь доноров выдерживают при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин; отделяют сгусток фибрина от стенок пробирки и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин. Сыворотку осторожно отделяют пипеткой и переносят в чистую пробирку. Полученные пробы используют свежеприготовленными, либо маркируют и хранят до исследования при температуре от 2 до 8°C не более 1 суток или при температуре не выше минус 20°C не более 6 мес.

3.2. Разведения исследуемых сывороток

Исследуемые сыворотки разводят рабочим раствором ФСБ-Т-БСА до разведения 1:100. Полученные растворы сывороток допускается хранить при температуре минус 20°C не более 6 мес или с добавлением мертиолята натрия до конечного разведения 1:10000 при температуре от 2 до 8°C не более 1 мес.

4. Подготовка растворов и реагентов

Набор перед использованием необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 18 до 25°C .

4.1. Промывающий раствор ФСБ-Т

Смешивают 25 мл ФСБ-Т₂₅ и 600 мл воды очищенной (далее воды).

Раствор хранят при температуре от 2 до 8°C не более 2 сут или при температуре минус 10°C не более 7 сут.

4.2. Рабочий раствор ФСБ-Т-БСА

Содержимое флакона с БСА растворяют в течение 20 мин при перемешивании в 100 мл промывающего раствора ФСБ-Т.

Раствор хранению не подлежит.

4.3. Рабочие растворы K^+ , K^-

Содержимое ампул (флаконов) с K^+ и K^- растворяют в течение 10 мин в воде, в объеме, указанном на этикетке. Полученные растворы допускается хранить при температуре не выше минус 20°C не более 6 мес или с добавлением мертиолята натрия 1:10000 при температуре от 2 до 8°C не более 1 мес.

Для получения рабочих разведений K^+ и K^- , указанных на этикетках, объем растворов K^+ и K^- , доводят до необходимого ФСБ-Т-БСА. Рабочие растворы K^+ , K^- хранению не подлежат.

4.4. Рабочее разведение К (конъюгата)

Конъюгат (К) растворяют в течение 10 мин в воде, в объеме, указанном на этикетке. Полученный раствор К допускается хранить при температуре не выше минус 20 °С не более 6 мес. Полученный раствор разводят до рабочего разведения раствором ФСБ-Т-БСА. Рабочий раствор К хранению не подлежит.

4.5. Раствор ТМБ (хромогена)

Содержимое флакона с ТМБ растворяют в 20 мл ЦБР.

Раствор готовят непосредственно перед использованием. Полученный раствор необходимо беречь от света. Раствор хранению не подлежит.

5. Проведение иммуноферментного анализа

5.1. Подготовка планшетов

Планшеты однократно отмывают ФСБ-Т при помощи автоматического или ручного промывающего устройства, заливая в каждую лунку промывающий раствор не менее чем на $\frac{2}{3}$ ее объема с экспозицией 1-3 мин. После чего промывающий раствор удаляют. Планшеты тщательно осушают постукиванием по фильтровальной бумаге, сложенной в несколько слоев.

5.2. Внесение растворов

В 6 лунок (11-12А, 11-12В и 11-12С) вносят по 100 мкл раствора ФСБ-Т-БСА. Лунка 12А служит для выведения фотометра на нулевую отметку при учете результатов. Лунки 11А, 11-12В и 11-12С служат для контроля конъюгата.

5.3. Внесение рабочих растворов K^+ , K^-

В пару лунок нечетного и четного рядов планшета (например: 11-12D, 11-12E) вносят по 100 мкл приготовленных растворов K^+ и K^- в рабочих разведениях.

5.4. Внесение растворов исследуемых сывороток

В парные лунки нечетного и четного рядов планшета (например: 1-2А, 3-4А и т.д.) вносят по 100 мкл раствора исследуемого материала.

При исследовании различных разведений анализируемого материала допускается титрование в лунках планшета. Для этого в каждую пустую лунку планшета вносят по 100 мкл раствора ФСБ-Т-БСА. Для каждой анализируемой пробы используют одну пару лунок (например: 1-2Н), в которые вносят по 100 мкл приготовленного раствора пробы в разведении 1:100. Последующие пары лунок параллельного ряда (в нашем примере: 1-2G, 1-2F и т.д.) используют для титрования данной пробы. Титрование проводят с помощью многоканальной пипетки: из каждой пары лунок переносят по 100 мкл раствора в следующие пары лунок, каждый раз перемешивая содержимое лунок 6-8 раз, при этом, в каждой лунке ряда титрования должно оставаться по 100 мкл раствора, из последней пары лунок ряда титрования 100 мкл раствора удаляют. Таким образом, на планшете в парных лунках 1-2 рядов от Н до А

получают ряд двукратных разведений пробы от 1:100 до 1:12800. При необходимости исследования меньшего количества различных разведений одной пробы, в последующие пары лунок вносят растворы новых проб.

5.5. Планшеты закрывают крышками или фольгой и выдерживают при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. Содержимое лунок удаляют. Планшеты трижды отмывают ФСБ-Т при помощи автоматического или ручного промывающего устройства, заливая в каждую лунку промывающий раствор не менее чем на $\frac{2}{3}$ ее объема с экспозицией 1-3 мин. После чего промывающий раствор удаляют. Планшеты тщательно осушают постукиванием по фильтровальной бумаге, сложенной в несколько слоев.

5.6. Внесение раствора конъюгата (K)

В каждую лунку (кроме 12А) заливают по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении. В лунку 12А вносят 100 мкл раствора ФСБ-Т-БСА. Планшеты закрывают крышками или фольгой и выдерживают при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. Затем планшеты отмывают и осушают, как указано выше (п.5.5).

5.7. Внесение раствора ТМБ (хромогена) и стоп-реактанта

Во все лунки планшета вносят по 100 мкл приготовленного раствора хромогена и инкубируют в течение 5-7 мин при комнатной температуре $20-25^\circ\text{C}$ в защищенном от света месте.

Затем в каждую лунку вносят по 50 мкл стоп-реактанта.

5.8. При проведении ИФА предусматривают следующие контроли:

1. Исследование контрольных образцов сывороток K^+ и K^- для определения специфической активности набора. Реакцию считают подлежащей учету, если:

- разница ОП в лунках отрицательного контрольного образца (K^-) нечетного и четного рядов $\leq 0,05$ ($\leq$ МОП контроля конъюгата) и среднее значение ОП отрицательного контрольного образца $\leq 0,250$;

- разница ОП в лунках положительного контрольного образца (K^+) нечетного и четного ряда $\geq 0,05$ ($\geq$ МОП контроля конъюгата).

2. Контроль специфической активности конъюгата, который характеризует взаимодействие иммобилизованных A^+ и A^- с конъюгатом. Среднее арифметическое оптических плотностей (МОП) в лунках контроля конъюгата не должно превышать 0,2.

6. Учет результатов

6.1. Результаты реакции учитывают спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Для каждого исследуемого разведения K^+ и K^- подсчитывают разницу оптических плотностей (ОП) в парных лунках нечетных и четных рядов, затем определяют

среднее арифметическое оптических плотностей (МОП) в лунках для контроля конъюгата.

6.2. Положительный результат. Считают, что исследуемая сыворотка содержит антитела (IgG) к ортопоксвирусам, если разница значений ОП в реакциях с вирусным (лунка нечетного ряда) и контрольным (лунка четного ряда) антигенами, полученных в ИФА исследуемой пробы, составляет $\geq 0,05$ (МОП контроля конъюгата в данном случае должен быть $\leq 0,05$). Если МОП контроля конъюгата составляет от 0,051 до 0,2 положительным результатом считают, если разница значений ОП в лунках нечетного и четного ряда в ИФА исследуемой пробы $\geq$ МОП контроля конъюгата.

6.3. Интерпретация результатов.

При исследовании сывороток крови здоровых людей с целью изучения иммуноструктуры населения и проведения сероэпидемиологических исследований выявление IgG к ортопоксвирусам в однократно взятых пробах, как правило, отражает иммунологический эффект от предшествующей специфической вакцинации.

При тестировании проб, взятых однократно, даже высокое значение ОП не является доказательством острой инфекции.

При обследовании больных с подозрением на оспенную инфекцию нужно взять парные пробы крови. Первую пробу берут в начале заболевания: не позднее, чем через 5-7 дней после появления симптомов заболевания. Вторую пробу берут через 14-21 день после первой пробы. Исследование парных сывороток должно проводиться в одном и том же опыте. Положительным результатом считают, если в парных пробах при исследовании в разведениях 1:200 и более выявлены титры или титры проб различаются в 2 и более раза.

ФОРМА ВЫПУСКА

Иммуносорбент	- 2 планшета
K ⁺	- 1 амп. или 1 фл., 0,2 мл
K ⁻	- 1 амп. или 1 фл., 0,2 мл
K	- 1 амп. или 1 фл., 0,2 или 0,4 мл
ТМБ	- 1 фл., 5 мл
БСА	- 1 фл., 1 г
ФСБ-Т _{×25}	- 1 фл., 25 мл
ЦБР	- 1 фл., 20 мл
Стоп-реагент	- 1 фл., 12 мл

Набор реагентов упаковывают в коробку из картона. В коробку с набором реагентов вкладывают инструкцию по применению, нож или скарификатор ампульный (при упаковке ампул, не имеющих кольца излома или точки для вскрытия).

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью
первого заместителя
генерального директора
ФГБУ «НПО «Живоген»
Минздрава России
по дов. [подпись] [подпись]

