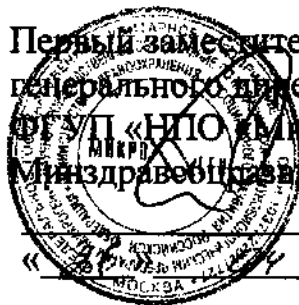


Приказом Росздравнадзора
от _____ 201__ г. № _____

Первый заместитель
генерального директора
ФГУП «НПО «Микроген»
Минздравсоцразвития России
П.В. Смачков
_____ 201__ г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
Тест-система иммуноферментная для выявления антигена ортопоксвирусов
Комплект № 1

Набор реагентов Тест-система иммуноферментная для выявления антигена ортопоксвирусов включает следующие реагенты для проведения иммуноферментного анализа:

1. ИГГ – иммуноглобулин G против вируса осповакцины, выделенный из гипериммунной сыворотки крови кроликов, иммунизированных вирусом осповакцины. Аморфный порошок или пористая масса белого цвета или со светло-желтым оттенком.

2. ИГ – иммуноглобулин – иммуноглобулиновая фракция, полученная из гипериммунной сыворотки крови кроликов, иммунизированных вирусом осповакцины. Аморфный порошок или пористая масса белого цвета или со светло-желтым оттенком.

3. А⁺ – антиген вируса осповакцины – вакцина оспенная живая. Пористая масса бело-серого или светло-желтого цвета.

4. К (конъюгат) – ИГГ против вируса осповакцины, выделенный из иммуноглобулиновой фракции гипериммунной сыворотки крови кроликов, иммунизированных вирусом осповакцины, конъюгированный с пероксидазой хрена. Аморфный порошок или пористая масса белого цвета или со светло-желтым оттенком.

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. КББк - концентрат карбонатно-бикарбонатного буферного раствора – для приготовления рабочего раствора КББ для разведения ИГГ. Прозрачная бесцветная жидкость.

8. ФСБ-Т_{x25} – 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.

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

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

11. Планшеты монокристаллические полистироловые 96-луночные – для ИФА с высокой сорбционной способностью.

Принцип метода: набор должен давать в ИФА положительную реакцию с А⁺ при использовании реагентов набора в их рабочих разведениях.

Набор рассчитан на исследование 88 проб с учетом проведения положительного контрольного опыта (подтверждение титра антигена вируса вакцины) и контроля конъюгата.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления антигена ортопиксвирусов» предназначен для выявления антигена ортопиксвирусов (вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, вакцины) в материалах кожных поражений (везикулярной и пустулезной жидкостей, суспензии корок и др.) от людей и животных, в культуральной жидкости инфицированных клеточных культур методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Область применения – лабораторная диагностика, 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 50 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;

- прибор для учета результатов реакции (фотометр);

- пипетки стеклянные градуированные 2-го класса точности вместимостью 10; 5; 2; 1 мл;

- холодильник бытовой (любого типа);

- термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;

- часы (любого типа);

- группа резиновая;

- перчатки резиновые хирургические;

- бумага фильтровальная лабораторная;

- вода очищенная;

- дезинфицирующий раствор: 3 % раствор водорода перекиси, 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 раствора ТМБ. Для отбора исследуемых образцов и реагентов тест-системы необходимо использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5 %. Отбор реагентов следует производить чистыми наконечниками для автоматических пипеток.

2. Меры предосторожности

В состав набора входит реагент (антиген вируса осповакцины), содержащий вирус осповакцины, который относится к IV группе патогенности и может инфицировать персонал в процессе анализа. Кроме того, представляет опасность исследуемый материал кожных поражений от людей и животных (везикулярной и пустулезной жидкостей, суспензии корок и др.), культуральная жидкость инфицированных клеточных культур, которые содержат или могут содержать ортопоксвирусы. Поэтому, в целях предупреждения распространения инфекции внутри лаборатории, необходимо соблюдение санитарно-гигиенических правил 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)»:

- 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 перекиси водорода или 3 % раствор хлорамина в течение 4 ч) или автоклавированием при давлении пара 0,2 МПа и температуре $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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 антигена вируса осповакцины из наборов реагентов серий с истекшим сроком годности проводят после обеззараживания автоклавированием при давлении пара 0,2 МПа, температуре $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 45 мин согласно СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

3. Подготовка исследуемого материала

Для анализа пригодны материалы кожных поражений (везикулярной и пустулезной жидкостей, суспензии корок и др.) от людей и животных, культуральная жидкость инфицированных клеточных культур.

Для выявления антигенов ортопокквирусов возможно использование, как свежеприготовленного материала, так и хранившегося при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут или при минус 20 °С не более 3 мес.

3.1. Подготовка материала кожных поражений

Для исследования в ИФА необходима проба в количестве не менее 200 мкл.

Исследованию в ИФА подвергают клинический материал, полученный в соответствии с «Инструкцией по лабораторной диагностике натуральной оспы» (1972 г.). Корки и соскоб растирают в ступке, добавляя раствор натрия хлорида 0,9 % для инъекций или буферный раствор Мак-Ильвейна pH от 7,2 до 7,4 в количестве 200 мкл. Везикулярную или пустулезную жидкость разводят теми же растворами до получения 200 мкл материала или используют для исследования в неразведенном виде, если объем клинического материала не менее 200 мкл.

3.2. Подготовка мозговой суспензии

Для исследования мозга инфицированных животных (или мозговой ткани, взятой в случае летального исхода от людей) необходимо приготовить 1 % суспензию на растворе натрия хлорида 0,9 % для инъекций. Суспензию центрифугируют при 3000-6000 об/мин в течение 20-30 мин; надосадочную жидкость переносят в стерильную пробирку, маркируют и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут или при минус 20 °С не более 3 мес. В ИФА проверяют как неразведенную суспензию, так и в разведении 1:10 и более.

3.3. Подготовка культуральной жидкости

Культуральную жидкость зараженных клеточных культур перед испытанием в ИФА центрифугируют при 3000-6000 об/мин в течение 20-30 мин. В ИФА исследуют как неразведенные пробы, так и в разведении 1:2 и более.

3.4. Использование проб

Приготовленные пробы используют свежеприготовленными, либо маркируют и хранят до исследования при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток или при температуре не выше минус 20 °С не более 3 мес.

100 мкл подготовленной пробы используют для реакции «гашения», для чего пробу соединяют с равным объемом раствора ИГ в рабочем разведении. Смесь исследуемой пробы с ИГ (реакция «гашения») выдерживают в течение 1 ч при температуре (37±1) °С.

4. Подготовка растворов и реагентов

Набор перед проведением ИФА необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре 18-25 °С.

4.1. Промывающий раствор ФСБ-Т

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

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

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. Рабочий раствор КББ для разведения ИГГ

Содержимое ампулы с КББ доводят водой до 20 мл.

Раствор хранят не более 1 сут при температуре от 2 до 8 °С и не более 7 сут при температуре не выше минус 10 °С.

4.4. Рабочий раствор ИГГ

Содержимое ампулы (флакона) с ИГГ растворяют в течение 10 мин в воде, в объеме, указанном на этикетке, затем разбавляют до рабочего разведения КББ.

Раствор хранят не более 1 сут при температуре от 2 до 8 °С и не более 7 сут при температуре не выше минус 10 °С.

4.5. Рабочий раствор ИГ

Содержимое ампулы (флакона) с ИГ растворяют в течение 10 мин в объеме воды, указанном на этикетке. Растворенный в воде ИГ допускается хранить не более 6 мес при температуре не выше минус 20 °С. До рабочего разведения растворенный ИГ разводят раствором ФСБ-Т-БСА. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.6. Рабочий раствор А⁺ (антиген вируса осповакцины)

Содержимое ампулы (флакона) с А⁺ растворяют в течение 1 мин, в воде, в объеме, указанном на этикетке. Растворенный в воде А⁺ допускается хранить не более 6 мес при температуре не выше минус 20 °С. Полученный раствор А⁺ разводят раствором ФСБ-Т-БСА до получения рабочего разведения, указанного на этикетке. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.7. Раствор реакции «гашения» (А⁺ + ИГ)

0,5 мл рабочего разведения А⁺ соединяют с 0,5 мл рабочего раствора ИГ. Смесь выдерживают в течение 1 ч при температуре (37±1) °С. Смесь хранению не подлежит.

4.8. Рабочее разведение К (конъюгата)

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

4.9. Раствор ТМБ (хромогена)

Раствор хромогена готовят непосредственно перед использованием: содержимое флакона с ТМБ растворяют в 20 мл ЦБР. Полученный раствор беречь от света. Раствор хранению не подлежит.

5. Проведение иммуноферментного анализа

5.1. Сорбция ИГГ на поверхности лунок планшета для ИФА

Во все лунки планшета (кроме 12А, которую используют для выведения фотометра на нулевую отметку при учете результатов) вносят по 100 мкл рабочего раствора ИГГ.

Планшет закрывают крышкой и выдерживают в течение 2-2,5 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, а затем в течение 18-20 ч при температуре от 2 до 8°C .

Планшет, с иммобилизованным на поверхности лунок ИГГ, отмывают ФСБ-Т при помощи автоматического или ручного промывающего устройства. В процессе отмывания в каждую лунку планшета заливают промывающий раствор не менее $\frac{2}{3}$ ее объема с экспозицией 1-3 мин. Промывающий раствор удаляют. Операцию проводят трижды. По окончании промывки лунки тщательно осушают, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге (фильтровальную бумагу для осушения планшетов меняют на каждом этапе ИФА).

Внимание! Планшеты, на поверхности лунок которых иммобилизован ИГГ, допускается хранить в закрытых полиэтиленовых пакетах при температуре не выше минус 10°C не более 14 сут, перед использованием однократно отмывают ФСБ-Т.

5.2. Внесение растворов исследуемых проб

Положительный контроль A^+

В лунку 12А вносят 100 мкл раствора ФСБ-Т-БСА.

Пару лунок, например 11-12 ряда D используют для исследования раствора A^+ . В лунки 11D вносят 100 мкл исследуемого раствора A^+ в рабочем разведении, в лунку 12D вносят 100 мкл смеси реакции «гашения» ($A^+ + \text{ИГ}$).

Контроль конъюгата

5 лунок, например 11А, 11В, 12В, 11С и 12С используют для контроля конъюгата, на первом этапе реакции в них вносят по 100 мкл раствора ФСБ-Т-БСА.

Во всех остальных лунках планшета проводят исследование проб. Для каждой пробы используют пару лунок. В лунку нечетного ряда (например 1Н) вносят 100 мкл исследуемой пробы, в парную лунку четного ряда (2Н) вносят смесь реакции «гашения» данной исследуемой пробы (исследуемая проба + ИГ).

С целью исследования различных разведений одной пробы допускается проводить титрование в параллельных рядах планшета с помощью многоканальной пипетки. Для исследования разведений пробы используют лунки двух парных рядов, в один ряд вносят разведения исследуемой пробы, в парные лунки другого ряда – разведения «реакции гашения» данной пробы (исследуемая проба + ИГ). В выбранные ряды (например 3 и 4) вносят по 100 мкл раствора ФСБ-Т-БСА, в лунку 3Н вносят 100 мкл исследуемой пробы, в лунку 4Н вносят 100 мкл смеси реакции «гашения» (исследуемая проба + ИГ). Затем содержимое лунок 3Н и 4Н перемешивают 6-8 раз при помощи многоканальной пипетки, используя индивидуальные наконечники, и переносят по 100 мкл раствора в парные лунки следующего ряда (из 3-4Н в 3-4 G, из 3-4 G в 3-4F, из 3-4F в 3-4E и т.д. до 3-4 А). Из лунок 3-4 А по 100 мкл раствора удаляют. В результате в парных лунках двух параллельных

Планшеты закрывают крышками или фольгой и выдерживают в течение 1 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Затем планшеты отмывают и осушают, как указано в п. 5.1.

5.5. Внесение хромогена и стоп-реактента

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

Затем в каждую лунку планшета вносят по 50 мкл стоп-реактента.

6. Учет результатов

6.1. Результат реакции учитывают спектрофотометрически. Учет проводят при длине волны 450 нм. Прибор выводят на нулевую отметку, используя лунку 12А. Реакцию учитывают, если среднее арифметическое значение оптической плотности (МОП) в лунках для контроля конъюгата не превышает 0,1.

6.2. Подсчитывают разность ОП в лунках нечетного ряда, куда был внесен раствор A^+ и в соответствующей парной лунке четного ряда, куда был внесен раствор реакции «гашения» данного разведения A^+ . Разница в значениях ОП должна составлять не менее 0,05 и превышать МОП контроля конъюгата.

6.3. Подсчитывают разность ОП между лунками нечетного ряда, куда был внесен раствор исследуемой пробы и соответствующей парной лунки четного ряда, куда был внесен раствор реакции «гашения» данной исследуемой пробы.

6.4. За титр исследуемой пробы принимают её наивысшее разведение, при котором разница в значениях ОП составляет не менее 0,05 и превышает МОП контроля конъюгата. Если МОП контроля конъюгата составляет от 0,051 до 0,1 за титр исследуемой пробы принимают ее максимальное разведение, при котором разница значений ОП в лунках нечетного и четного ряда равна или более значения МОП контроля конъюгата.

ФОРМА ВЫПУСКА

Иммуносорбент	-2 планшета
A^+	- 1 амп. или 1 фл., 0,2 мл
ИГ	- 1 амп. или 1 фл., 0,2 мл
К	- 1 амп. или 1 фл., 0,2 мл
ТМБ	- 1 фл., 5 мл
БСА	- 1 фл., 1 г
ФСБ-Т ₂₅	- 1 фл., 25 мл
ЦБР	- 1 фл., 20 мл
Стоп-реактент	- 1 фл., 12 мл

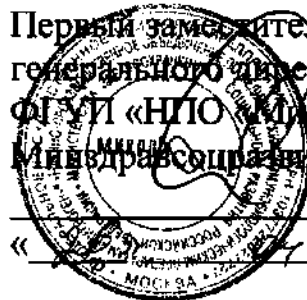
В коробку с набором вкладывают инструкцию по применению, нож или скарифика-

ПЕРВЫЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬ
Протокол, пропущенный директором
скреплено печатью ФГУП «НПО «Микроген»
_____ 2 _____ лист _____
_____ 000211 П.Б.



Приказом Росздравнадзора
от _____ 201__ г. № _____

Первый заместитель
генерального директора
ФГУП «НПО «Микроген»
Минздрава России
П.В. Смачков
_____ 201__ г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
Тест-система иммуноферментная для выявления антигена ортопоксвирусов
Комплект № 2

Набор реагентов Тест-система иммуноферментная для выявления антигена ортопоксвирусов включает следующие реагенты для проведения иммуноферментного анализа:

1. Иммуносорбент - иммуноглобулин G против вируса осповакцины, выделенный из гипериммунной сыворотки крови кроликов, иммунизированных вирусом осповакцины, сорбированный в лунках планшетов полистироловых 96-луночных для ИФА с высокой сорбционной способностью.

2. ИГ – иммуноглобулин – иммуноглобулиновая фракция, полученная из гипериммунной сыворотки крови кроликов, иммунизированных вирусом осповакцины. Аморфный порошок или пористая масса белого цвета, или со светло-желтым оттенком.

3. А⁺ – антиген вируса осповакцины – вакцина оспенная живая. Пористая масса бело-серого или светло-желтого цвета.

4. К (конъюгат) – ИГG против вируса осповакцины, выделенный из иммуноглобулиновой фракции гипериммунной сыворотки крови кроликов, иммунизированных вирусом вакцины, конъюгированный с пероксидазой хрена. Аморфный порошок или пористая масса белого цвета или со светло-желтым оттенком.

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-Т₂₅ – 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 серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость.

Принцип метода: набор должен давать в ИФА положительную реакцию с А⁺ при использовании реагентов набора в их рабочих разведениях.

Набор рассчитан на исследование 88 проб с учетом проведения положительного контрольного опыта (подтверждение титра антигена вируса вакцины) и контроля конъюгата.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления антигена ортопоксвирусов» предназначен для выявления антигена ортопоксвирусов (вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, вакцины) в материалах кожных поражений (везикулярной и пустулезной жидкостей, суспензии корок и др.) от людей и животных, в культуральной жидкости инфицированных клеточных культур методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Область применения – лабораторная диагностика, 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 50 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;
- прибор для учета результатов реакции (фотометр);
- пипетки стеклянные градуированные 2-го класса точности вместимостью 10; 5; 2;

1 мл;

- холодильник бытовой (любого типа);
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- часы (любого типа);
- груша резиновая;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- вода очищенная;
- дезинфицирующий раствор: 3 % раствор водорода перекиси, 3 % раствор хлорамин-на.

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 объёмов не более 5 %. Отбор реагентов следует производить чистыми наконечниками для автоматических пипеток.

2. Меры предосторожности

В состав набора входит реагент (антиген вируса вакцины), содержащий вирус осповакцины, который относится к IV группе патогенности и может инфицировать персонал в процессе анализа. Кроме того, представляет опасность исследуемый материал кожных поражений от людей и животных (везикулярной и пустулезной жидкостей, суспензии корок и др.), культуральная жидкость инфицированных клеточных культур, которые содержат или могут содержать ортопоксвирусы. Поэтому, в целях предупреждения распространения инфекции внутри лаборатории, необходимо соблюдение санитарно-гигиенических правил 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)»:

- 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 перекиси водорода или 3 % раствор хлорамина в течение 4 ч) или автоклавированием при давлении пара 0,2 МПа и температуре $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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 антигена вируса осповакцины из наборов реагентов серий с истекшим сроком годности проводят после обеззараживания автоклавированием при давлении пара 0,2 МПа, температуре $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 45 мин согласно СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

3. Подготовка исследуемого материала

Для анализа пригодны материалы кожных поражений (везикулярной и пустулезной жидкостей, суспензии корок и др.) от людей и животных, культуральная жидкость инфицированных клеточных культур.

Для выявления антигенов ортопоквирусов возможно использование, как свежеприготовленного материала, так и хранившегося при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут или при минус 20 °С не более 3 мес.

3.1. Подготовка материала кожных поражений

Для исследования в ИФА необходима проба в количестве не менее 200 мкл.

Исследованию в ИФА подвергают клинический материал, полученный в соответствии с «Инструкцией по лабораторной диагностике натуральной оспы» (1972 г.). Корки и соскоб растирают в ступке, добавляя раствор натрия хлорида 0,9 % для инъекций или буферный раствор Мак-Ильвейна рН от 7,2 до 7,4 в количестве 200 мкл. Везикулярную или пустулезную жидкость разводят теми же растворами до получения 200 мкл материала или используют для исследования в неразведенном виде, если объем клинического материала не менее 200 мкл.

3.2. Подготовка мозговой суспензии

Для исследования мозга инфицированных животных (или мозговой ткани, взятой в случае летального исхода от людей) необходимо приготовить 1 % суспензию на растворе натрия хлорида 0,9 % для инъекций. Суспензию центрифугируют при 3000-6000 об/мин в течение 20-30 мин, надосадочную жидкость переносят в стерильную пробирку, маркируют и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут или при минус 20 °С не более 3 мес. В ИФА проверяют как неразведенную суспензию, так и в разведении 1:10 и более.

3.3. Подготовка культуральной жидкости

Культуральную жидкость зараженных клеточных культур перед испытанием в ИФА центрифугируют при 3000-6000 об/мин в течение 20-30 мин. В ИФА исследуют как неразведенные пробы, так и в разведении 1:2 и более.

3.4. Использование проб

Приготовленные пробы используют свежеприготовленными, либо маркируют и хранят до исследования при температуре от 2 до 8 °С в течении 1 суток или при температуре не выше минус 20 °С не более 3 мес.

100 мкл подготовленной пробы используют для реакции «гашения», для чего пробу соединяют с равным объемом раствора ИГ в рабочем разведении. Смесь исследуемой пробы с ИГ (реакция «гашения») выдерживают в течение 1 ч при температуре (37±1) °С.

4. Подготовка растворов и реагентов

Набор перед проведением ИФА необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре 18-25 °С.

4.1. Промывающий раствор ФСБ-Т

Смешивают 25 мл ФСБ-Т_{х25} и 600 мл воды очищенной (далее воды).

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

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. Рабочий раствор ИГ

Содержимое ампулы (флакона) с ИГ растворяют в течение 10 мин в воде, в объеме, указанном на этикетке. Растворенный в воде ИГ допускается хранить не более 6 мес при температуре не выше минус 20 °С. До рабочего разведения растворенный ИГ разводят раствором ФСБ-Т-БСА. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.4. Рабочий раствор A⁺ (антиген вируса осповакцины)

Содержимое ампулы (флакона) с A⁺ растворяют в течение 1 мин в воде, в объеме, указанном на этикетке. Растворенный в воде A⁺ допускается хранить не более 6 мес при температуре не выше минус 20 °С. Полученный раствор A⁺ разводят раствором ФСБ-Т-БСА до получения рабочего разведения, указанного на этикетке. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.5. Раствор реакции «гашения» (A⁺ + ИГ)

0,5 мл рабочего разведения A⁺ соединяют с 0,5 мл рабочего раствора ИГ. Смесь выдерживают в течение 1 ч при температуре (37±1) °С. Смесь хранению не подлежит.

4.6. Рабочее разведение К (конъюгата)

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

4.7. Раствор ТМБ (хромогена)

Раствор хромогена готовят непосредственно перед использованием: содержимое флакона с ТМБ растворяют в 20 мл ЦБР. Полученный раствор беречь от света. Раствор хранению не подлежит.

5. Проведение иммуноферментного анализа

5.1. Планшет, с иммобилизованным на поверхности лунок ИГГ, отмывают ФСБ-Т при помощи автоматического или ручного промывающего устройства. В процессе отмывания в каждую лунку планшета заливают промывающий раствор не менее 2/3 ее объема с экспозицией 1-3 мин. Промывающий раствор удаляют. Операцию проводят однократно. По окончании промывки лунки тщательно осушают, постукивая перевернутым планшетом по

сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге (фильтровальную бумагу для осушения планшетов меняют на каждом этапе ИФА).

5.2. Внесение растворов исследуемых проб

Положительный контроль A^+

В лунку 12A вносят 100 мкл раствора ФСБ-Т-БСА.

Пару лунок, например 11-12 ряда D используют для исследования раствора A^+ . В лунку 11D вносят 100 мкл исследуемого раствора A^+ в рабочем разведении, в лунку 12D вносят 100 мкл смеси реакции «гашения» (A^+ +ИГ).

Контроль конъюгата

5 лунок, например 11A, 11B, 12B, 11C и 12C используют для контроля конъюгата, на первом этапе реакции в них вносят по 100 мкл раствора ФСБ-Т-БСА.

Во всех остальных лунках планшета проводят исследование проб. Для каждой пробы используют пару лунок. В лунку нечетного ряда (например 1H) вносят 100 мкл исследуемой пробы, в парную лунку четного ряда (2H) вносят смесь реакции «гашения» данной исследуемой пробы (исследуемая проба+ИГ).

С целью исследования различных разведений одной пробы допускается проводить титрование в параллельных рядах планшета с помощью многоканальной пипетки. Для исследования разведений пробы используют лунки двух парных рядов, в один ряд вносят разведения исследуемой пробы, в парные лунки другого ряда – разведения реакции «гашения» данной пробы (исследуемая проба + ИГ). В выбранные ряды (например 3 и 4) вносят по 100 мкл раствора ФСБ-Т-БСА, в лунку 3H вносят 100 мкл исследуемой пробы, в лунку 4H вносят 100 мкл смеси реакции «гашения» (исследуемая проба + ИГ). Затем содержимое лунок 3H и 4H перемешивают 6-8 раз при помощи многоканальной пипетки, используя индивидуальные наконечники, и переносят по 100 мкл раствора в парные лунки следующего ряда (из 3-4H в 3-4 G, из 3-4 G в 3-4F, из 3-4F в 3-4E и т.д. до 3-4 A). Из лунок 3-4 A по 100 мкл раствора удаляют. В результате в парных лунках двух параллельных рядов планшета остается по 100 мкл двукратных разведений проб с 1:2 до 1:128 (если исследуемый материал не имел исходного разведения), из последних лунок по 100 мкл раствора удаляют.

5.3. Планшеты закрывают крышками или фольгой и выдерживают в течение 1 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Содержимое лунок удаляют, планшеты омывают и сушат, как указано в п.5.1.

5.4. Внесение конъюгата

В каждую лунку (кроме 12A) вносят по 100 мкл раствора К (конъюгата) в рабочем разведении. В лунку 12A вносят 100 мкл раствора ФСБ-Т-БСА.

Планшеты закрывают крышками или фольгой и выдерживают в течение 1 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Затем планшеты отмывают и осушают, как указано в п. 5.1.

5.5. Внесение хромогена и стоп-реактанта

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

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

6. Учет результатов

6.1. Результат реакции учитывают спектрофотометрически. Учет проводят при длине волны 450 нм. Прибор выводят на нулевую отметку, используя лунку 12А. Реакцию учитывают, если среднее арифметическое значение оптической плотности (МОП) в лунках для контроля конъюгата не превышает 0,1.

6.2. Подсчитывают разность ОП в лунках нечетного ряда, куда был внесен раствор A^+ и в соответствующей парной лунке четного ряда, куда был внесен раствор реакции «гашения» данного разведения A^+ . Разница в значениях ОП должна составлять не менее 0,05 и превышать МОП контроля конъюгата.

6.3. Подсчитывают разность ОП между лунками нечетного ряда, куда был внесен раствор исследуемой пробы и соответствующей парной лунки четного ряда, куда был внесен раствор реакции «гашения» данной исследуемой пробы.

6.4. За титр исследуемой пробы принимают её наивысшее разведение, при котором разница в значениях ОП составляет не менее 0,05 и превышает МОП контроля конъюгата. Если МОП контроля конъюгата составляет от 0,051 до 0,1 за титр исследуемой пробы принимают её максимальное разведение, при котором разница значений ОП в лунках нечетного и четного ряда равна или более значения МОП контроля конъюгата.

ФОРМА ВЫПУСКА

Иммуносорбент	-2 планшета
A^+	- 1 амп. или 1 фл., 0,2 мл
ИГ	- 1 амп. или 1 фл., 0,2 мл
К	- 1 амп. или 1 фл., 0,2 мл
ТМБ	- 1 фл., 5 мл
БСА	- 1 фл., 1 г
ФСБ-Т _{х25}	- 1 фл., 25 мл
ЦБР	- 1 фл., 20 мл
Стоп-реактент	- 1 фл., 12 мл

В коробку с набором вкладывают инструкцию по применению, нож или скарифика-

тор ампульный (при упаковке ампул, не имеющих кольца излома или точки для вскрытия).

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности – 6 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности неиспользованию не подлежит.

Хранить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Транспортировать в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Допускается кратковременное (до 48 ч) транспортирование при температуре от 9 до 25 °С. Замораживание не допускается.

Рекламации на качество набора направлять в адрес предприятия-изготовителя ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России, 115088, г. Москва, ул. 1-я Дубровская, д. 15, тел. (495) 710-37-87.

Адрес производства: Россия, 634040, Томская область, г. Томск, ул. Игнатовского, д. 8, тел. (3822) 63-37-34.

Ответственный за производство:

Директор филиала
ФГУП «НПО Микроген»
Минздравсоцразвития России
в г. Томск

В.П. Морозов

« 20 » _____ 04 _____ 2011 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»
д.м.н., профессор



В.В. Долгов

« 10 » _____ 04 _____ 2011 г.

ПЕРВЫЙ ЗАРЕГИСТРИРОВАННЫЙ
ГРУППА ВНЕШНИХ
ЭКОНОМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ
И ДОМ № 47 П/Б-32