

«СОГЛАСОВАНО»

Директор
ФГБНУ НИИВС
им. И.И. Мечникова


О.А. Свити́ч
« 18 » 08 2020 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник Управления
регистрации
и медицинских исследований
АО «НПГ «Микроген»


А.Е. Ершов
« 14 » 08 2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

**Диагностикум клещевого энцефалита сухой для РТГА, РСК, РРГ
по ТУ 21.10.60-071-20401675-2019**

Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03138

НАЗНАЧЕНИЕ

Изделие для диагностики *in vitro* предназначено для выявления антител к вирусу клещевого энцефалита (КЭ) в образцах сыворотки (плазмы) крови человека в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), реакции связывания комплемента (РСК) и реакции радиального гемолиза в геле (РРГ).

Функциональное назначение – вспомогательное средство в диагностике клещевого энцефалита.

Показания к применению изделия в соответствии с его назначением.

Противопоказания при применении изделия согласно инструкции – отсутствуют.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

Состав медицинского изделия:

1. Диагностикум КЭ инактивированный – 10 амп. по 1 мл;
2. К⁺ РТГА – 2 амп. по 1 мл;
3. К⁻ РТГА – 2 амп. по 1 мл;
4. К⁺ РСК – 2 амп. по 0,5 мл;
5. К⁻ РСК – 2 амп. по 0,5 мл;
6. Смесь солей для приготовления ББР – 3 пакета по 1 табл.;
7. Смесь солей для приготовления ФБР – 2 пакета по 4 табл.;
8. Смесь солей для приготовления раствора Альсевера – 1 пакет, 5 табл.;
9. Каолин – 1 стакан, 60 г.

Комплектация: компоненты изделия в коробке из картона вместе с инструкцией по применению, паспорт (в комплекте поставки).

Характеристика компонентов изделия.

1. Диагностикум клещевого энцефалита (диагностикум КЭ) – антиген вируса КЭ, полученный из мозга нелинейных белых мышей, инфицированных вирусом КЭ, методом боратно-солевой экстракции, очищенный протамином сульфатом или фреоном (хладоном-113), инактивированный бета-пропиолактоном, лиофилизированный – аморфный порошок кремового цвета, после растворения – прозрачная жидкость светло-желтого цвета, выпускаемый в комплекте с реагентами для постановки РТГА, РСК и РРГ. Титр специфических гемагглютининов не ниже чем 1:160, комплементсвязывающих антигенов – не ниже чем 1:32.

2. Положительный контрольный образец для РТГА (К⁺ РТГА) – асцитная жидкость крыс, иммунизированных вирусом КЭ в виде 10 % вирусодержащей суспензии мозга крысят-сосунков с последующим введением в брюшную полость крыс клеток опухоли яичника крысы для индукции асцита, обработанная хлороформом, каолином и гусиными эритроцитами,

лиофилизированная – пористая масса кремового или коричневого цвета, после растворения – прозрачная жидкость от светло-желтого до светло-коричневого цвета. Титр антигеммагглютинирующих антител – не ниже чем 1:160.

3. Отрицательный контрольный образец для РТГА (K^- РТГА) – асцитная жидкость не иммунизированных крыс, индуцированная путем введения клеток опухоли яичника крысы, обработанная хлороформом, каолином и гусиными эритроцитами, лиофилизированная – пористая масса кремового или коричневого цвета, после растворения – прозрачная жидкость от светло-желтого до светло-коричневого цвета.

4. Положительный контрольный образец для РСК (K^+ РСК) – асцитная жидкость крыс, иммунизированных вирусом КЭ (как описано для K^+ РТГА), обработанная хлороформом, лиофилизированная – пористая масса кремового или коричневого цвета, после растворения – прозрачная жидкость от желтого до коричневого цвета. Титр комплементсвязывающих антител не ниже чем 1:32.

5. Отрицательный контрольный образец для РСК (K^- РСК) – асцитная жидкость не иммунизированных крыс, обработанная хлороформом, лиофилизированная – пористая масса кремового или коричневого цвета, после растворения – прозрачная жидкость от желтого до коричневого цвета.

6. Смесь солей для приготовления боратного буферного раствора (ББР) pH $9,00 \pm 0,05$ – таблетка белого цвета массой $1,05 \pm 0,02$ г, в состав которой входят: натрия хлорид, кислота борная, кальция стеарат (наполнитель). 1 пакет (1 таблетка) рассчитан для приготовления 100 мл раствора ББР.

7. Смесь солей для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) pH $6,20 \pm 0,05$ – таблетки белого цвета общей массой $4,12 \pm 0,08$ г, в состав которых входят: натрия хлорид, динатрия гидрофосфат додекагидрат/натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, натрия дигидрофосфат дигидрат/натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный, кальция стеарат. 1 пакет (4 таблетки) рассчитан для приготовления 100 мл раствора ФБР.

8. Смесь солей для приготовления раствора Альсевера – таблетки белого цвета общей массой $5,30 \pm 0,10$ г, в состав которых входят: кислота лимонная моногидрат, натрия цитрат моногидрат/натрий лимоннокислый 5,5-водный, декстрозы моногидрат, кальция стеарат. 1 пакет (5 таблеток) рассчитан для получения 100 мл раствора.

9. Каолин (белая глина) – белый порошок с сероватым, желтоватым или зеленоватым оттенком, для обработки исследуемых образцов перед анализом.

ПРИНЦИП МЕТОДА И ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Специфическим компонентом набора является диагностикум КЭ, который способен выявлять антитела к вирусу клещевого энцефалита в сыворотках (плазме) крови человека в РТГА, РСК и РРГ.

Принцип РТГА: диагностикум КЭ (антиген вируса клещевого энцефалита) способен вызывать агглютинацию взвеси гусиных эритроцитов в зоне слабокислых значений pH. В присутствии сыворотки, содержащей антитела к вирусу клещевого энцефалита, агглютинация тормозится (подавляется), благодаря блокировке антителами к вирусу КЭ ответственного за этот феномен антигена – гемагглютенина (ГА), обычно располагающегося на поверхности вириона.

Принцип РСК: комплекс антиген-антитело обладает способностью связывать комплемент. В реакции участвуют две системы антиген+антитело: специфическая (диагностикум КЭ + сыворотка/плазма крови человека) и индикаторная (эритроциты барана + гемолизин). После взаимодействия (на первом этапе реакции) вирусных антигенов КЭ с антителами из сыворотки/плазмы, с комплексом антиген-антитело связывается комплемент, и он уже не может быть использован для лизиса эритроцитов (которые в смеси с гемолизином добавляют на втором этапе реакции). Таким образом, отсутствие лизиса эритроцитов говорит о положительном результате реакции (наличии антител к вирусу КЭ в исследуемом образце).

Принцип РРГ: при взаимодействии с антителами сенсibilизированных вирусным антигеном эритроцитов барана в присутствии комплемента происходит реакция лизиса эритроцитов. Суспензию бараньих эритроцитов обрабатывают диагностикумом КЭ, отмывают и вносят в расплавленный агарозный гель, одновременно добавляя туда комплемент. После перемешивания гель тонким слоем наливают на стеклянную пластину и после затвердения вырезают в нем лунки диаметром 2 мм. В лунки наливают по 5 мкл исследуемой сыворотки/плазмы (предварительно прогретой для удаления содержащегося в них комплемента). Диффундируя через гель, антитела образуют комплекс с антигеном и комплементом на поверхности эритроцитов, следствием чего является лизис. Вокруг лунок образуется прозрачная зона гемолиза, диаметр которой пропорционален концентрации специфических антител к вирусу КЭ.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Изделие предназначено для лабораторной диагностики, для однократного применения по назначению. Изделие является нестерильным.

Вид анализа – полуколичественный. Целевой анализ – антитела к вирусу КЭ.

Изделие ремонту и обслуживанию не подлежит. Монтаж, наладка, калибровка и прочие операции, необходимые для ввода МИ в эксплуатацию и его правильной эксплуатации не требуются.

ПРИНЦИП МЕТОДА И ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Специфическим компонентом набора является диагностикум КЭ, который способен выявлять антитела к вирусу клещевого энцефалита в сыворотках (плазме) крови человека в РТГА, РСК и РРГ.

Принцип РТГА: диагностикум КЭ (антиген вируса клещевого энцефалита) способен вызывать агглютинацию взвеси гусиных эритроцитов в зоне слабокислых значений pH. В присутствии сыворотки, содержащей антитела к вирусу клещевого энцефалита, агглютинация тормозится (подавляется), благодаря блокировке антителами к вирусу КЭ ответственного за этот феномен антигена – гемагглютиниона (ГА), обычно располагающегося на поверхности вириона.

Принцип РСК: комплекс антиген-антитело обладает способностью связывать комплемент. В реакции участвуют две системы антиген+антитело: специфическая (диагностикум КЭ + сыворотка/плазма крови человека) и индикаторная (эритроциты барана + гемолизин). После взаимодействия (на первом этапе реакции) вирусных антигенов КЭ с антителами из сыворотки/плазмы, с комплексом антиген-антитело связывается комплемент, и он уже не может быть использован для лизиса эритроцитов (которые в смеси с гемолизином добавляют на втором этапе реакции). Таким образом, отсутствие лизиса эритроцитов говорит о положительном результате реакции (наличии антител к вирусу КЭ в исследуемом образце).

Принцип РРГ: при взаимодействии с антителами сенсibilизированных вирусным антигеном эритроцитов барана в присутствии комплемента происходит реакция лизиса эритроцитов. Суспензию бараньих эритроцитов обрабатывают диагностикумом КЭ, отмывают и вносят в расплавленный агарозный гель, одновременно добавляя туда комплемент. После перемешивания гель тонким слоем наливают на стеклянную пластину и после затвердения вырезают в нем лунки диаметром 2 мм. В лунки наливают по 5 мкл исследуемой сыворотки/плазмы (предварительно прогретой для удаления содержащегося в них комплемента). Диффундируя через гель, антитела образуют комплекс с антигеном и комплементом на поверхности эритроцитов, следствием чего является лизис. Вокруг лунок образуется прозрачная зона гемолиза, диаметр которой пропорционален концентрации специфических антител к вирусу КЭ.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Изделие предназначено для лабораторной диагностики, для однократного применения по назначению. Изделие является нестерильным.

Вид анализата – полуколичественный. Целевой анализат – антитела к вирусу КЭ.

Изделие ремонту и обслуживанию не подлежит. Монтаж, наладка, калибровка и прочие операции, необходимые для ввода МИ в эксплуатацию и его правильной эксплуатации не требуются.

Набор реагентов рассчитан на исследование 200 образцов одновременно в трех тестах: РТГА, РСК, РРГ.

Пользователями изделия могут быть медицинские специалисты по лабораторной диагностике с высшим и средним специальным образованием, прошедшие специальную подготовку и допущенные к работе с патогенными микроорганизмами в соответствии с СП 1.3.2322-08 (без выделения возбудителя).

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

РТГА является высокочувствительным анализом. Для флавивирусов (к которым относится вирус КЭ) РТГА дает группоспецифический ответ (т.е. может выявлять антитела как к видоспецифичным, так и группоспецифичным антигенным детерминантам флавивирусов). В частности, могут наблюдаться перекрестные реакции с сыворотками, содержащими антитела против вирусов комплекса КЭ и комплекса японского энцефалита, но на уровне значительно ниже, чем с гомологичным антигеном.

РСК относится к числу малочувствительных методов (выявляет антитела, когда их много), при этом наряду с видоспецифичными могут обнаруживаться (в меньшей степени) и группоспецифичные антитела флавивирусов. При анализе в РСК могут наблюдаться также перекрестные реакции с сыворотками, содержащими антитела к антигенам мозговой ткани мышей. Обнаружение специфических комплементсвязывающих антител свидетельствует о недавно перенесенной инфекции.

РРГ обладает чувствительностью на уровне не ниже, чем в РТГА. В данной реакции IgG-антитела выявляются даже спустя годы после заболевания.

При анализе исследуемых образцов положительным результатом в РТГА следует считать титр не ниже 1:20, в РСК – не ниже 1:4, в РРГ – зону гемолиза не менее 4 мм.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ИЗДЕЛИЕМ

Класс потенциального риска применения набора – 2б.

Медицинское изделие является безопасным при транспортировании, хранении и применении и не приносит вреда окружающей природной среде и здоровью человека. Изделие специфически безопасно (не содержит материалов, которые могут инфицировать персонал во время анализа). Диагностикум КЭ и положительные контрольные образцы для РТГА и РСК комплектуются в набор только после подтверждения специфической безопасности.

Однако при работе с исследуемым материалом следует соблюдать правила техники безопасности в соответствии с ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», исследования без выделения возбудителя могут проводиться в лабораториях, имеющих разрешительные документы на работу с микроорганизмами III - IV групп патогенности в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп пато-

генности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» с дополнениями СП 1.3.2518-09 и СП 1.3.2885-11.

Необходимо:

- работать с применением индивидуальных средств защиты (защитной одежды, одноразовых резиновых перчаток, шапочки, защитного экрана или очков);
- использовать автоматические пипетки (дозаторы) с одноразовыми пластиковыми накопечниками;
- оборудование, находившееся в контакте с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать 70 % этиловым спиртом;
- все использованные материалы, сточные растворы, одноразовую лабораторную посуду перед утилизацией следует обеззараживать, как потенциально инфицированный материал, физическими или химическими методами по режимам в соответствии с СП 1.3.2322-08 (предпочтительный и унифицированный режим обеззараживания – автоклавирование при температуре $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$, 0,2 МПа в течение 45 мин).

Утилизация изделий, пришедших в негодность, с истекшим сроком годности и изделий после контакта с биологическими образцами осуществляется в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

МЕРЫ ПО СНИЖЕНИЮ РИСКОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ИЗДЕЛИЯ.

При работе с изделием следует учитывать требования СП 3.1.3.2352-08 «Профилактика клещевого вирусного энцефалита. Санитарно-эпидемиологические правила», СП 3.1.3310-15 «Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами. Санитарно-эпидемиологические правила».

Требования к персоналу, который проводит исследования, изложено в СП 1.3.2322-08.

Объективные результаты анализа гарантируются при выполнении следующих условий:

- хранение всех реагентов набора осуществлять при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$;
- не использовать реагенты с истекшим сроком годности;
- перед использованием набор необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 $^\circ\text{C}$;
- не использовать реагенты набора при отсутствии на их упаковке соответствующей маркировки;
- для проведения анализа использовать реагенты, входящие в данный набор и предусмотренные настоящей инструкцией.

—

ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С ИЗДЕЛИЕМ:

- рН-метр;
- весы торсионные;
- часы;
- дозаторы переменного объема (механические или электронные): 8- или 12-канальные с объемом дозирования от 5 до 50 мкл и 1-канальные с объемом дозирования от 1 до 5 (10) мкл, от 10 (20) до 100 (200) мкл, от 100 до 1000 мкл и от 1 до 10 мл;
- наконечники, соответствующие дозаторам;
- пипетки стеклянные градуированные 2-го класса точности вместимостью 10; 5; 2; 1 мл (ГОСТ 1770);
- холодильник бытовой;
- водяная баня (аппарат для инактивации сывороток);
- термостат;
- центрифуга лабораторная (1000-2500 об/мин);
- штативы для пробирок;
- планшеты для иммунологических реакций;
- чашки Петри диаметром 100 мм;
- стаканы химические мерные или колбы мерные вместимостью 100 мл, 1000 мл (ГОСТ 1770 или ГОСТ 25336);
- пробирки стеклянные вместимостью 10 мл (ГОСТ 25336) или флаконы вместимостью 10-20 мл;
- груша резиновая;
- шприц вместимостью 10 или 20 мл;
- бумага фильтровальная (ГОСТ 12026);
- вода очищенная (ФС.2.2.0020.18) или вода дистиллированная (ГОСТ Р 58144), далее - вода;
- раствор натрия хлорида 0,9 % (рН 7,2-7,4) стерильный.

Другие реактивы и материалы, необходимые для постановки анализов, описаны ниже в разделе «ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА» и в соответствующих подразделах «Подготовка реагентов для проведения анализа».

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа пригодны сыворотки или плазмы крови человека, полученные стандартными лабораторными методами. Возможно использование плазмы с добавлением цитрата, гепарина или этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

Все образцы должны быть промаркированы (идентифицированы).

Для проведения анализа не следует использовать мутную, хилезную, гемолизированную сыворотку/плазму крови во избежание ошибочных результатов. Пробы сыворотки/плазмы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 2 недель или при температуре не выше минус 20 °С не более 1 года аликвотами (их повторное замораживание и размораживание не рекомендуется). Образцы, содержащие осадок, следует очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 10 мин.

Для РТГА исследуемые образцы перед анализом на антитела к вирусу КЭ обрабатывают каолином, чтобы удалить неспецифические ингибиторы гемагглютинации (ГА), а затем освобождают от нормальных гетероагглютининов, адсорбируя их эритроцитами гуся.

Для РСК исследуемые образцы сывороток (плазм) перед анализом прогревают для инактивации содержащегося в них комплемента. Образцы разводят Разбавителем (приготовление см. п. 2.1.1) 1:4 или 1:8 и прогревают при температуре 57-59 °С в течение 30 мин.

Для подтверждения клинического диагноза у больных с подозрением на клещевой энцефалит исследуют парные сыворотки, полученные на 5-7 и 14-21 дни заболевания.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Реакция торможения гемагглютинации.

Реакцию ставят микрометодом в общем объеме 0,1 мл. Для постановки реакции используют многоканальные пипетки с объемом дозирования 5-50 мкл и погрешностью измерения объемов не более 3 % и планшеты для иммунологических реакций по ТУ 64-2-278-79.

Реакцию ставят в два этапа. Первый этап опыта – постановка реакции гемагглютинации (РГА) для определения титра диагностикума КЭ и его рабочего разведения; второй этап – постановка РТГА для определения титра исследуемых и контрольных образцов.

1.1. Подготовка реагентов для проведения анализа.

1.1.1. Боратный буферный раствор pH 9,00±0,05 (ББР).

Содержимое пакета со смесью солей (1 таблетка) растворяют в 100 мл воды при температуре 18-25 °С в течение 18-20 ч с последующим перемешиванием. При необходимости, для ускорения растворения подогревают на водяной бане при температуре 80-90 °С, перемешивают, охлаждают до температуры 18-25 °С. Нерастворимый осадок (наполнитель) отделяют фильтрованием через бумажный фильтр, после чего pH раствора доводят до 9,00±0,05 добавлением 2-2,2 мл 4 % раствора натрия гидроксида* по ГОСТ 4328, pH определяют потенциометрически.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

*Примечание: 4 % раствор натрия гидроксида хранят при температуре 20-25 °С в пластиковом флаконе не более 14 сут, в стеклянном флаконе – не более 7 сут.

1.1.2. Фосфатный буферный раствор pH 6,20±0,05 (ФБР).

Содержимое пакета со смесью солей (4 таблетки) растворяют в 100 мл воды при температуре 18-25 °С в течение 18-20 ч с последующим перемешиванием. При необходимости для ускорения растворения подогревают на водяной бане при температуре 80-90 °С, перемешивают, охлаждают до температуры 18-25 °С. Нерастворимый осадок (наполнитель) отделяют фильтрованием через бумажный фильтр, рН определяют потенциометрически.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

1.1.3. Раствор Альсевера.

Содержимое пакета (5 таблеток) растворяют в 100 мл воды при температуре 18-25 °С в течение 18-20 ч с последующим перемешиванием. При необходимости для ускорения растворения подогревают на водяной бане при температуре 80-90 °С, перемешивают, охлаждают до температуры 18-25 °С. Нерастворимый осадок (наполнитель) отделяют фильтрованием через бумажный фильтр.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

Допускается вместо раствора Альсевера применять рабочий раствор гепарина с активностью 2,5-3 МЕ в 1 мл. Для приготовления рабочего раствора гепарин с активностью 5000 МЕ в 1 мл смешивают с раствором натрия хлорида 0,9 % в соотношении 1:2000 или 1:1500.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

1.1.4. Взвесь каолина 25 %.

30 г каолина соединяют со 120 мл ББР при постоянном помешивании. Используют не ранее, чем через 1 сут после приготовления, перед использованием тщательно взбалтывают.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С, срок хранения не ограничен.

1.1.5. Взвесь эритроцитов гусей в ФБР 0,4 %.

Кровь у гусей-доноров берут из подкрыльцевой вены шприцем. Для предотвращения свертывания и консервации кровь смешивают с равным объемом раствора Альсевера или рабочего раствора гепарина.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 8 сут.

Для получения эритроцитов непосредственно перед использованием необходимое количество крови центрифугируют при 1500-1800 об/мин в течение 8-10 мин. Осадок эритроцитов трижды отмывают, ресуспендируя в 10-15 кратном объеме раствора натрия хлорида 0,9 % и осаждают центрифугированием при 1500-1800 об/мин в течение 8-10 мин. Надосадочную жидкость сливают.

К 25 мл ФБР добавляют 0,1 мл эритроцитов из осадка. Взвесь эритроцитов хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

Неразведенные эритроциты (осадок) используют для подготовки исследуемых образцов (см. п. 1.1.9). Хранению не подлежат.

Содержимое пакета со смесью солей (4 таблетки) растворяют в 100 мл воды при температуре 18-25 °С в течение 18-20 ч с последующим перемешиванием. При необходимости для ускорения растворения подогревают на водяной бане при температуре 80-90 °С, перемешивают, охлаждают до температуры 18-25 °С. Нерастворимый осадок (наполнитель) отделяют фильтрованием через бумажный фильтр, рН определяют потенциометрически.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

1.1.3. Раствор Альсевера.

Содержимое пакета (5 таблеток) растворяют в 100 мл воды при температуре 18-25 °С в течение 18-20 ч с последующим перемешиванием. При необходимости для ускорения растворения подогревают на водяной бане при температуре 80-90 °С, перемешивают, охлаждают до температуры 18-25 °С. Нерастворимый осадок (наполнитель) отделяют фильтрованием через бумажный фильтр.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

Допускается вместо раствора Альсевера применять рабочий раствор гепарина с активностью 2,5-3 МЕ в 1 мл. Для приготовления рабочего раствора гепарин с активностью 5000 МЕ в 1 мл смешивают с раствором натрия хлорида 0,9 % в соотношении 1:2000 или 1:1500.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

1.1.4. Взвесь каолина 25 %.

30 г каолина соединяют со 120 мл ББР при постоянном помешивании. Используют не ранее, чем через 1 сут после приготовления, перед использованием тщательно взбалтывают.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С, срок хранения не ограничен.

1.1.5. Взвесь эритроцитов гусей в ФБР 0,4 %.

Кровь у гусей-доноров берут из подкрыльцевой вены шприцем. Для предотвращения свертывания и консервации кровь смешивают с равным объемом раствора Альсевера или рабочего раствора гепарина.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 8 сут.

Для получения эритроцитов непосредственно перед использованием необходимое количество крови центрифугируют при 1500-1800 об/мин в течение 8-10 мин. Осадок эритроцитов трижды отмывают, ресуспендируя в 10-15 кратном объеме раствора натрия хлорида 0,9 % и осаждают центрифугированием при 1500-1800 об/мин в течение 8-10 мин. Надосадочную жидкость сливают.

К 25 мл ФБР добавляют 0,1 мл эритроцитов из осадка. Взвесь эритроцитов хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

Неразведенные эритроциты (осадок) используют для подготовки исследуемых образцов (см. п. 1.1.9). Хранению не подлежат.

1.1.6. Диагностикум КЭ.

Содержимое ампулы с диагностикумом КЭ растворяют в 1 мл воды, через 1-2 мин добавляют 9 мл ББР, выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 1-1,5 ч для стабилизации (разведение 1:10).

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

1.1.7. Положительный контрольный образец для РТГА (К⁺ РТГА).

В ампулу с К⁺ РТГА вносят 1 мл воды, выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 1-1,5 ч для стабилизации.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

1.1.8. Отрицательный контрольный образец для РТГА (К⁻ РТГА).

В ампулу с К⁻ РТГА вносят 1 мл воды, выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 1-1,5 ч для стабилизации.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

1.1.9. Исследуемые образцы.

Исследуемые образцы (сыворотки, плазмы) обрабатывают каолином и гусиными эритроцитами для удаления неспецифических гемагглютининов и ингибиторов гемагглютинации. К 0,1 мл исследуемого образца добавляют 0,4 мл ББР и 0,5 мл 25 % взвеси каолина, смесь встряхивают в течение 20-25 мин при температуре 20-25 °С вручную или на аппарате для встряхивания, центрифугируют при 2000-2500 об/мин в течение 30-35 мин.

К надосадочной жидкости добавляют 0,025 мл неразведенных эритроцитов (из осадка, получение описано в п. 1.1.5). Пробирку со смесью помещают на лед для предотвращения гемолиза, встряхивают в течение 20-30 мин, затем центрифугируют при 1800-2000 об/мин в течение 15-20 мин. В результате обработки получают 0,6-0,8 мл исследуемого образца в разведении 1:10.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут, при температуре не выше минус 20 °С не более 1 года.

1.2. Проведение реакции гемагглютинации (РГА).

1.2.1. Определение титра и рабочего разведения диагностикума КЭ.

В 3 ряда лунок планшета для иммунологических реакций вносят по 0,05 мл ББР. В первую лунку каждого ряда вносят по 0,05 мл диагностикума КЭ. Перемешивают 8-10 раз при помощи многоканальной пипетки и последовательно переносят во все лунки рядов по 0,05 мл, из последней лунки убирают 0,05 мл. Получают последовательные разведения диагностикума КЭ с коэффициентом 2. Ставят контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию: по 0,05 мл ББР вносят в 2-3 лунки. Во все лунки добавляют по 0,05 мл 0,4 % взвеси эритроцитов. Планшет встряхивают в горизонтальной плоскости, выдерживают при температуре от 18 до 25 °С в течение

ние 30-40 мин.

Учет реакции проводят при отсутствии агглютинации в лунках контроля эритроцитов. Результаты учитывают визуально по 4-крестовой системе:

- плюс 4 (+4) – полная гемагглютинация (однородная пленка эритроцитов, покрывающая дно лунки);
- плюс 3 (+3) – гемагглютинация меньшей степени интенсивности (однородная пленка эритроцитов со следами плотного осадка эритроцитов);
- плюс 2 (+2) – частичная гемагглютинация (однородная пленка эритроцитов на дне лунки в сочетании с более плотным осадком эритроцитов);
- плюс 1 (+1) – следы гемагглютинации (следы однородной пленки эритроцитов на дне лунки в сочетании с плотным осадком эритроцитов);
- минус (–) – отсутствие гемагглютинации (осевшие эритроциты имеют вид компактного осадка).

Положительным результатом в РГА считают агглютинацию эритроцитов на +3 и +4. За титр диагностикума КЭ принимают его максимальное разведение, давшее гемагглютинацию не менее чем на +3.

В РТГА диагностикум КЭ используют в рабочем разведении, содержащем 8 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ). Например, при титре диагностикума 1:320 – в разведении 1:40: к 2 мл диагностикума КЭ в разведении 1:10 добавляют 6 мл ББР.

Перед постановкой РТГА приготовленное рабочее разведение диагностикума КЭ контролируют в РГА.

1.2.2. Контроль рабочего разведения диагностикума КЭ.

В 3 ряда лунок вносят по 0,05 мл ББР, затем вносят в первую лунку каждого ряда по 0,05 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении (например, 1:40). Раститровывают так, как описано при постановке РГА. Ставят контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию: в 2-3 лунки вносят по 0,05 мл ББР. Во все лунки добавляют по 0,05 мл 0,4 % взвеси эритроцитов.

Планшет встряхивают в горизонтальной плоскости и выдерживают при температуре от 18 до 25 °С в течение 30-40 мин. Результаты учитывают при отсутствии агглютинации в лунках контроля эритроцитов.

Рабочее разведение используют для постановки РТГА, если по результатам контроля в нем содержится 8 ГАЕ (наблюдается гемагглютинация в трех его последовательных двукратных разведениях не менее чем на +3). Если рабочее разведение диагностикума КЭ по результатам контроля не содержит 8 ГАЕ, то его необходимо приготовить заново, изменив соотношение диагностикума КЭ и разбавителя в зависимости от результата контроля. Контроль рабочего разведения повторяют.

1.3. Проведение анализа РТГА.

В РТГА титруют исследуемые образцы (у больных одновременно титруют парные сыворотки (плазмы)), а также K^+ РТГА и K^- РТГА.

В 4 ряда лунок планшета для иммунологических реакций, начиная со второй в каждом ряду (внесение ингредиентов в лунки планшета см. Таблицу 1), вносят по 0,025 мл ББР, затем в первые и вторые лунки вносят по 0,025 мл исследуемых и контрольных образцов, соответственно маркировке рядов. Перемешивают 8-10 раз при помощи пипетки и последовательно переносят, начиная со второй, во все лунки рядов. Получают разведения исследуемых и контрольных образцов с коэффициентом 2. В каждую лунку добавляют по 0,025 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении (в нашем примере – 1:40).

Одновременно ставят контроли:

- контроль исследуемых и контрольных образцов на полноту удаления неспецифических гемагглютининов – в лунку вносят по 0,025 мл пробы и ББР;
- контроль исследуемых и контрольных образцов на полноту удаления ингибиторов гемагглютинации – 4-5 капель пробы кипятят 1-3 мин, после чего вносят 0,025 мл в лунку и добавляют 0,025 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении;
- контроль рабочего разведения диагностикума КЭ проводят дважды: в день постановки опыта и в день учета результатов (см. п.1.2.2);
- контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию – в 2-3 лунки вносят по 0,05 мл ББР.

Таблица 1

*Внесение ингредиентов в лунки планшета для иммунологических реакций
при проведении анализа РТГА*

Наименование ингредиентов	Номера рядов	Разведение исследуемых и контрольных образцов (в обратных величинах)							Контроль			Контроль рабочего разведения диагностикума			
		10	20	40	80	160	320	640	Исследуем. и контрольных образцов на полноту удаления неспецифических гемагглютининов	Исследуем. и контрольных образцов на полноту удаления ингибиторов гемагглютинации	Эритроцитов на спонтанную агглютинацию	Разведение диагностикума (в обратных величинах)			
												80	160	320	640
ББР	1-4		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025						
К ⁺ РТГА	1	0,025	0,025	переносят по 0,025					0,025	0,025*					
Исследуемый образец I	2	0,025	0,025	переносят по 0,025					0,025	0,025*					
Исследуемый образец II	3	0,025	0,025	переносят по 0,025					0,025	0,025*					
К ⁻ РТГА	4	0,025	0,025	переносят по 0,025					0,025	0,025*					
Диагностикум КЭ в рабочем разведении (1:40)	1-4	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025		0,025					
Эритроциты	1-4	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05					
ББР	5-7										0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Диагностикум КЭ в рабочем разведении (1:40)	5-7											0,05	переносят по 0,05		
Эритроциты	5-7										0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

Примечания: указано количество ингредиентов в мл;

* – исследуемый и контрольный образцы, прогретые при температуре 100 °С.

После соединения ингредиентов (компонентов смеси) планшет встряхивают в горизонтальной плоскости, выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 18-20 ч. Затем во все лунки добавляют по 0,05 мл 0,4 % взвеси эритроцитов, планшет встряхивают в горизонтальной плоскости и выдерживают при температуре от 18 до 25 °С в течение 30-40 мин, после чего учитывают результаты.

2. Реакция связывания комплемента.

Реакцию ставят микрометодом в общем объеме 0,125 мл. Для постановки реакции используют многоканальные пипетки с объемом дозирования 5-50 мкл, погрешностью измерения объемов не более 5 % и планшеты для иммунологических реакций.

Реакцию ставят в два этапа. Первый этап – определение титра комплемента в присутствии диагностикума КЭ и выбор его рабочего разведения, содержащего 2 единицы комплемента. Второй этап – определение титра исследуемых и контрольных образцов методом линейного титрования с использованием 4 комплементсвязывающих единиц (КСЕ) диагностикума КЭ.

2.1. Подготовка реагентов для анализа.

2.1.1. Разбавитель.

В 1 л раствора натрия хлорида 0,9 % растворяют 0,1 г магния хлорида шестиводного по ГОСТ 4209 и 0,04 г кальция хлорида двуводного по ТУ 6-09-5077-83, фильтруют через бумажный фильтр.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

2.1.2. Диагностикум КЭ.

В ампулу с диагностикумом КЭ вносят 1 мл воды, через 1-2 мин готовят рабочее разведение, содержащее 4 КСЕ диагностикума КЭ, исходя из титра, указанного на ампуле (этикетке). Например, 1:8 (при титре в РСК 1:32): к 1 мл диагностикума КЭ добавляют 7 мл Разбавителя, выдерживают 1-1,5 ч при температуре от 2 до 8 °С для стабилизации.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

2.1.3. К⁺ РСК. В ампулу с К⁺ РСК вносят 0,5 мл воды, затем готовят разведение, соответствующее 4-кратному титру, указанному на ампуле (этикетке) контрольного образца, например, 1:16 (при титре 1:64): к 0,5 мл К⁺ РСК добавляют 7,5 мл Разбавителя. Прогревают на аппарате для инактивации сывороток (водяной бане) при температуре 59-61 °С в течение 30 мин.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

2.1.4. К⁻ РСК. В ампулу с К⁻ РСК вносят 0,5 мл воды, затем добавляют 3,5 мл Разбавителя (разведение 1:8). Прогревают на аппарате для инактивации сывороток (водяной бане) при температуре 59-61 °С в течение 30 мин.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

2.1.5. Исследуемые образцы. Подготовка образцов для анализа в РСК описана в разделе «АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ».

2.1.6. Комплемент.

В ампулу с «Комплементом сухим» (АО НПО «Микроген») вносят раствор натрия хлорида 0,9 % в объеме, указанном на ампуле (этикетке). Выдерживают для стабилизации при температуре от 2 до 8 °С в течение 1-1,5 ч. Используют в течение 1 сут.

2.1.7. Сыворотка гемолитическая.

Готовят рабочее разведение, соответствующее утроенному титру, указанному на ампуле (этикетке) гемолитической сыворотки (АО НПО «Микроген»). Например, 1:400 (при титре ге-

молитической сыворотки 1:1200): к 10 мл Разбавителя добавляют 0,025 мл гемолитической сыворотки из ампулы.

Хранение рабочего разведения: при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

2.1.8. Эритроциты барана.

Используют дефибрированную свежую кровь барана. Кровь у барана берут из яремной вены стерильной иглой во флакон со стеклянными бусами. Флакон с кровью непрерывно встряхивают вручную для дефибрирования крови. Дефибрированную кровь фильтруют через 2-3 слоя марли. Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 8 сут.

Для получения эритроцитов непосредственно перед использованием необходимое количество крови центрифугируют при 1800-2000 об/мин в течение 8-10 мин. Осадок эритроцитов трижды отмывают, ресуспендируя в 10-15 кратном количестве раствора натрия хлорида 0,9 % и осаждавая центрифугированием при 1800-2000 об/мин в течение 10-15 мин.

Готовят 2 % взвесь эритроцитов: к 9,8 мл Разбавителя добавляют 0,2 мл эритроцитов из осадка. Взвесь эритроцитов хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

2.1.9. Гемолитическая система (гемсистема).

Смесь равных объемов гемолитической сыворотки в рабочем разведении и 2 % взвеси эритроцитов: ингредиенты смешивают, приливая сыворотку ко взвеси эритроцитов, и прогревают в термостате при температуре от 36 до 38 °С в течение 30 мин, встряхивая каждые 10-15 мин. Используют сразу после приготовления. Гемсистему готовят дважды: в день титрования комплемента и в день учета результатов.

2.2. Проведение анализа.

2.2.1. Титрование комплемента.

В пробирках готовят ряд разведений комплемента (см. Таблицу 2): исходные – 1:10, 1:15, 1:25 – соединяя 0,3; 0,2 и 0,1 мл комплемента с 2,7; 2,8 и 2,4 мл Разбавителя соответственно. Из исходных концентраций комплемента, соединяя их и Разбавитель в равных объемах (по 1 мл), готовят разведения 1:20, 1:30, 1:50, и из них точно так же – разведения 1:40, 1:60, 1:100 и т.д.

Таблица 2

Разведение комплемента

Ингредиенты	Номера пробирок											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Абсолютные разведения комплемента	1:10	1:15	1:20	1:25	1:30	1:40	1:50	1:60	1:80	1:100	1:120	1:160
Разбавитель, мл	2,7	2,8	1,0	2,4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Комплемент, мл	0,3	0,2	1,0 из 1-й пр.	0,1	1,0 из 2-й пр.	1,0 из 3-й пр.	1,0 из 4-й пр.	1,0 из 5-й пр.	1,0 из 6-й пр.	1,0 из 7-й пр.	1,0 из 8-й пр.	1,0 из 9-й пр.

В соответствии с Таблицей 3 в 2 ряда лунок планшета для иммунологических реакций вносят по 0,025 мл Разбавителя, по 0,025 мл комплемента в разведениях, начиная с наибольшего, по 0,025 мл диагностикума КЭ в разведении 1:8. Ставят контроль гемсистемы: в 2-3 лунки вносят по 0,075 мл Разбавителя. Планшет помещают в термостат при температуре от 36 до 38 °С на 30 мин, после чего во все лунки добавляют по 0,05 мл гемсистемы, планшет встряхивают в горизонтальной плоскости, выдерживают при температуре от 36 до 38 °С в течение 30 мин, встряхивая через каждые 10-15 мин.

Таблица 3

Титрование комплемента: соединение ингредиентов и результаты

Ингредиенты	Номера лунк	Ингредиенты, мл												Контроль гемсистемы
		Разведения комплемента (в обратных величинах)												
		10	15	20	25	30	40	50	60	80	100	120	160	
Диагно- стикум КЭ (1:8)	1	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	
		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	
	2	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	
		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	
Разбави- тель	1-2	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,075
Гемсис- тема	1-2	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Результаты реак- ции	1	—	—	—	—	—	—	—	—	+1	+2	+3	+4	+4
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	+2	+2	+3	+4	+4

Результаты учитывают по 4-крестовой системе при условии полной задержки гемолиза в лунках контроля гемсистемы:

- плюс 4 (+4) – полная задержка гемолиза;
- плюс 3 (+3) – гемолиз незначительной массы эритроцитов (25 %);
- плюс 2 (+2) – гемолиз половины эритроцитов (50 %);
- плюс 1 (+1) – гемолиз основной массы эритроцитов (75 %);
- минус (–) – гемолиз всей массы эритроцитов (полный гемолиз).

За единицу комплемента (1 ед.) принимают его разведение в последней лунке с полным гемолизом. В нашем примере (Таблица 3) 1 ед. комплемента соответствует разведению 1:60; 2 ед. – разведению 1:30.

2.2.2. Определение титров антител к вирусу КЭ в исследуемых образцах.

Линейное титрование исследуемых образцов.

Определяют титры антител к вирусу клещевого энцефалита исследуемых и контрольных образцов. У больных одновременно титруют парные образцы сыворотки (или плазмы). Соедине-

ние ингредиентов при линейном титровании проводят в соответствии с Таблицей 5. Повышающиеся двукратные разведения исследуемых и контрольных образцов готовят в планшете: в 4 ряда лунок, начиная со вторых, вносят по 0,025 мл Разбавителя, в первую и вторую лунки каждого ряда вносят по 0,025 мл соответствующей пробы в исходном разведении 1:4 или 1:8. Перемешивают и переносят при помощи пипетки так, как описано выше, добавляют в каждую лунку по 0,025 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении 1:8 и по 0,025 мл комплемента в разведении, содержащем 2 ед. (например, 1:30).

Одновременно ставят контроли:

- контроль исследуемых и контрольных образцов на антикомплементарность – в лунку вносят по 0,025 мл образца в исходном разведении, 0,025 мл Разбавителя, 0,025 мл комплемента;
- контроль диагностикума КЭ на антикомплементарность – в лунку вносят по 0,025 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении, Разбавителя, комплемента;
- контроль диагностикума КЭ на гемотоксичность – в лунку вносят 0,025 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении и 0,05 мл Разбавителя;
- контроль гемсистемы – в 2-3 лунки вносят по 0,075 мл Разбавителя;
- контроль 4 КСЕ диагностикума КЭ – в лунках планшета (или вспомогательных пробирках) готовят разведения диагностикума КЭ на Разбавителе (от 1:8 до 1:64), затем в лунках планшета соединяют по 0,025 мл каждого из разведений диагностикума КЭ с 0,025 мл К⁺ РСК в 4-кратном титре (в нашем примере в разведении 1:16) и 0,025 мл комплемента.

Ставят контроль доз комплемента, использованных для анализа:

- 1) из рабочего разведения комплемента, содержащего 2 ед., готовят разведения, содержащие 1,5 ед.; 1 ед.; 0,5 ед. (соединение ингредиентов см. в Таблице 4);
- 2) соединяют по 0,025 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении, 0,025 мл каждого из разведений комплемента, 0,025 мл Разбавителя (см. Таблицу 5).

Таблица 4

Приготовление рабочих разведений комплемента

Ингредиенты	Разведения комплемента, ед.		
	1,5	1	0,5
Комплемент в рабочем разведении 2 ед.	1 мл	1 мл	1 мл
Разбавитель	0,33 мл	1 мл	3 мл

Планшет встряхивают в горизонтальной плоскости, выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 18-20 ч. После этого во все лунки вносят по 0,05 мл гемсистемы, встряхивают и выдерживают при температуре от 36 до 38 °С в течение 30-40 мин (каждые 10-15 мин встряхивают), затем учитывают результаты.

Таблица 5

Внесение ингредиентов в лунки планшета для иммунологических реакций в опыте РСК
(линейное титрование сывороток и контрольных образцов)

Ингредиенты, мл	Разведения ингредиентов	Ингредиенты, мл				Контроль 4 КСЕ диагностикума КЭ				Контроль доз комплемента				Контроль гемсистемы	Контроль исследуемых и контрольных образцов на антикомплементаемость
						Разведения диагностикума КЭ				Разведение комплемента					
		Диагностikum 1:8	Комплемент 2 ед.	Разбавитель	Гемсистема	1:8	1:16	1:32	1:64	2 ед.	1,5 ед.	1 ед.	0,5 ед.		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Исследуемый образец I	1:4	0,025 0,025	0,025		0,05										
	1:8	0,025 0,025	0,025		0,05										
	1:16	0,025 0,025	0,025		0,05										
	1:32	0,025 0,025	0,025		0,05										
Исследуемый образец II	1:8	0,025 0,025	0,025		0,05										
	1:16	0,025 0,025	0,025		0,05										
	1:32	0,025 0,025	0,025		0,05										
	1:64	0,025 0,025	0,025		0,05										
К ⁺ РСК	1:16	0,025 0,025	0,025		0,05										
	1:32	0,025 0,025	0,025		0,05										
	1:64	0,025 0,025	0,025		0,05										
	1:128	0,025 0,025	0,025		0,05										

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
К- РСК	1:8	0,025 0,025	0,025		0,05										
	1:16	0,025 0,025	0,025		0,05										
Контроль на антикомплементарность:															
Исследуемый образец I	1:4		0,025	0,025	0,05										0,025
Исследуемый образец II	1:8		0,025	0,025	0,05										0,025
К ⁺ РСК	1:16		0,025	0,025	0,05										0,025
К- РСК	1:8		0,025	0,025	0,05										0,025
Контроль диагностикума КЭ:															
На антикомплементарность		0,025	0,025	0,025	0,05										
На гемотоксичность		0,025		0,05	0,05										
Контроль 4 КСЕ диагностикума КЭ:															
К ⁺ РСК	1:8		0,025		0,05	0,025 0,025									
	1:8		0,025		0,05		0,025 0,025								
	1:8		0,025		0,05			0,025 0,025							
	1:8		0,025		0,05				0,025 0,025						
Контроль доз компонента		0,025 0,025 0,025 0,025		0,025 0,025 0,025 0,025	0,05 0,05 0,05 0,05					0,025		0,025		0,025	

3. Реакция радиального гемолиза в геле.

3.1. Подготовка реагентов для анализа.

3.1.1. Фосфатный буферный раствор (ФБР) pH 7,2-7,3.

Для приготовления раствора используют реактивы:

- натрия хлорид (ГОСТ 4233) – 8,0 г;
- калия хлорид (ГОСТ 4234) – 0,2 г;
- калия дигидрофосфат/калий фосфорнокислый однозамещенный (ГОСТ 4198) – 0,2 г;
- динатрия гидрофосфат додекагидрат /натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный (ГОСТ 4172) – 2,9 г;
- вода очищенная (ФС.2.2.0020.18) или вода дистиллированная (ГОСТ Р 58144), (далее – вода) – до 1 л.

pH должен быть 7,2-7,3. Определяют потенциометрически. ФБР используют для отмывания эритроцитов и приготовления агарозного геля.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °C не более 14 сут.

3.1.2. Боратный буферный раствор pH 9,00±0,05.

Для приготовления раствора используют реактивы:

- натрия хлорид – 0,7 г;
- кислота борная (ГОСТ 9656) – 0,32 г;
- 4 % раствор натрия гидроксида – 2-2,2 мл;
- вода – до 100 мл.

pH боратного буферного раствора доводят до 9,00±0,05 добавлением 4 % раствора натрия гидроксида. Определяют потенциометрически. Используют для приготовления рабочего раствора.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °C не более 14 сут.

3.1.3. Рабочий раствор (РР) – смесь боратного буферного раствора pH 9,00±0,05, фосфатного буферного раствора № 1 (pH 5,8) и фосфатного буферного раствора № 2 (pH 7,0).

В состав фосфатного буферного раствора № 1 входят:

- натрия хлорид – 0,88 г;
- натрия дигидрофосфат дигидрат /натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный (ГОСТ 245) – 2,86 г;
- динатрия гидрофосфат додекагидрат /натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный – 0,6 г;
- вода – до 100 мл.

В состав фосфатного буферного раствора № 2 входят:

- натрия хлорид – 0,88 г;

- натрия дигидрофосфат дигидрат /натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный – 1,24 г;
- динатрия гидрофосфат додекагидрат /натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный – 4,3 г;
- вода - до 100 мл.

Для приготовления растворов № 1 и № 2 реактивы в указанных количествах растворяют в воде. Для приготовления РР соединяют 10 частей боратного буферного раствора, 8 частей фосфатного буферного раствора № 1 и 2 части фосфатного буферного раствора № 2. рН раствора, контролируемый потенциометрически, должен быть $6,20 \pm 0,05$. РР стерилизуют в автоклаве при температуре $(120 \pm 1)^\circ\text{C}$ и давлении пара $(0,10 \pm 0,01)$ МПа в течение 30 мин.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C не более 14 сут.

3.1.4. Эритроциты барана.

Используют свежеприготовленную дефибринированную кровь (см. п. 2.1.8). Эритроциты осаждают и трижды отмывают в 3-4-кратном объеме раствора натрия хлорида 0,9 % рН 7,2-7,4, центрифугируя при 1800-2000 об/мин в течение 10-15 мин. Готовят 10 % взвесь эритроцитов на растворе натрия хлорида 0,9 %. Взвесь хранят в широкодонных колбах толщиной слоя не более 3 см при температуре от 2 до 8°C не более 3 сут.

3.1.5. Комплемент.

Для постановки РРГ пригоден «Комплемент сухой» (АО «НПО «Микроген») с активностью не ниже разведения 1:60 (см. постановку РСК). В ампулу вносят раствор натрия хлорида 0,9 % до объема, указанного на ампуле (этикетке). Используют в течение 1 сут.

3.1.6. Диагностикум КЭ.

В ампулу с диагностикумом КЭ вносят 1 мл воды. Выдерживают 1-1,5 ч при температуре от 2 до 8°C для стабилизации.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C не более 7 сут.

3.1.7. K^+ РСК.

В ампулу с K^+ РСК вносят 0,5 мл воды. K^+ РСК в количестве 0,1 мл прогревают 30 мин при температуре $59-61^\circ\text{C}$.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C не более 7 сут.

3.1.8. K^- РСК.

В ампулу с K^- РСК вносят 0,5 мл воды. Прогревают и хранят так же, как K^+ РСК.

3.1.9. Исследуемые образцы.

Нативные сыворотки (плазмы) крови человека в количестве 0,1 мл прогревают так же, как для РСК (см. раздел «АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ») без предварительного разведения Разбавителем.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

3.1.10. Раствор калия метапериодата в концентрации 0,001 М.

Навеску 0,023 г калия метапериодата по ТУ 6-09-02-364-83 растворяют в 100 мл РР.

Хранение: в темной посуде при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

3.1.11. Раствор борной кислоты 1 %. Навеску борной кислоты 1 г растворяют в 100 мл РР.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С, срок хранения не ограничен.

3.1.12. Сенсibilизация эритроцитов барана.

1,66 мл 10 % суспензии эритроцитов отмывают один раз в ФБР pH 7,2-7,3. К осадку отмытых эритроцитов добавляют 1,5 мл РР и 0,7 мл 0,001 М раствора калия метапериодата, перемешивают, выдерживают при температуре от 36 до 38 °С в течение 10 мин, затем дважды отмывают в 10-кратном объеме ФБР pH 7,2-7,3. Эритроциты осаждают центрифугированием при 1800-2000 об/мин в течение 10-15 мин, надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 1,5 мл РР. Полученную взвесь эритроцитов смешивают с 0,55 мл диагностикума КЭ, выдерживают при температуре от 18 до 25 °С в течение 10-15 мин, после чего эритроциты трижды отмывают в ФБР pH 7,2-7,3 так, как описано выше. К осадку эритроцитов добавляют 1,5 мл РР и 0,2-0,25 мл комплемента.

3.1.13. Приготовление агарозного геля. Для приготовления агарозного геля в одной чашке Петри диаметром 100 мм необходимо 0,07 г агарозы; 1,66 мл 10 % взвеси эритроцитов; 0,55 мл диагностикума КЭ; 0,20-0,25 мл комплемента; 0,1 мл 1 % раствора борной кислоты.

Подготовка агарозы.

К 0,07 г агарозы в стакане (флаконе) вместимостью 50-100 мл добавляют 13,8 мл ФБР pH 7,2-7,3 и кипятят на водяной бане 5-7 мин до полного расплавления агарозы. Расплавленную агарозу охлаждают до 42 °С и вносят 0,1 мл 1 % раствора борной кислоты.

Заливка чашек Петри.

Сенсибилизированные эритроциты, подготовленные так, как описано в п. 3.1.12., выливают в стакан (флакон) с расплавленной и охлажденной до 42 °С агарозой, смесь немедленно перемешивают до однородного состояния и заливают в чашку Петри, установленную горизонтально по уровню. Толщина пласта агарозного геля должна быть 2-3 мм. После застывания геля (через 3-5 мин) чашку закрывают крышкой и переворачивают на 30-40 мин для уплотнения геля. В застывшем слое агарозы металлической или стеклянной трубкой диаметром $(2,00 \pm 0,05)$ мм вырезают 20-40 лунок на расстоянии 13-20 мм друг от друга и отсасывают гель. Для выполнения этих манипуляций может служить игла для взятия крови диаметром 2 мм с отпиленным концом, соединенная с грушей.

3.2. Проведение анализа РРГ.

В лунки вносят по 5 мкл исследуемых образцов, а также контрольные образцы: K^+ РСК и K^- РСК. Чашку закрывают крышкой и выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 18-20 ч, а затем при температуре от 36 до 38 °С в течение 1,5-2,5 ч.

Параллельно с основным опытом ставят контрольный опыт на агарозной пластинке с не-сенсibilizированными эритроцитами для исключения неспецифического гемолиза. Подготовку эритроцитов для контрольного опыта проводят так же, как для основного, но их не соединяют с диагностикумом КЭ.

РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты РТГА, РСК, РРГ учитывают визуально.

Учет результатов в РТГА.

После добавления взвеси эритроцитов и экспозиции 30-45 мин учитывают результаты реакции. При наличии антител к вирусу КЭ в образце происходит торможение гемагглютинации. В этом случае эритроциты оседают на дне «пуговкой». При отрицательных результатах (отсутствии антител к вирусу КЭ) агглютинированные эритроциты прилипают к стенкам лунок в виде «зонтика».

Реакцию учитывают, если:

- наблюдается полное оседание эритроцитов (–) в контролях эритроцитов на спонтанную агглютинацию, контролях исследуемых и контрольных образцов на полноту удаления неспецифических гемагглютининов;
- наблюдается гемагглютинация не менее чем на +3 в контроле рабочего разведения диагностикума КЭ в трех последовательных разведениях, а также в контролях исследуемых и контрольных образцов на полноту удаления ингибиторов гемагглютинации.

За титр исследуемого или контрольного образца принимают их максимальное разведение, дающее полную (–) задержку гемагглютинации с 8 ГАЕ диагностикума.

В Таблице 6 приведен пример результатов РТГА. Титр K^+ РТГА – 1:320, исследуемого образца II – 1:40, исследуемый образец I и K^- РТГА не содержат антител к вирусу КЭ, реакция специфична, использовано 8 ГАЕ диагностикума КЭ.

Специфическим считают титр антител 1:20 и выше, сомнительным – 1:10. У больных диагностическим считают нарастание титра антител в парных исследуемых образцах в 4 раза и больше.

Таблица 6

Примерный протокол РТГА

Наименование рядов	Разведения исследуемых и контрольных образцов, -диагностикума КЭ (в обратных величинах)							Контроль исследуемых и контрольных образцов на полноту удаления неспецифических гемагглютининов	Контроль исследуемых и контрольных образцов на полноту удаления ингибиторов гемагглютинации
	10	20	40	80	160	320	640		
K ⁺ РТГА	–	–	–	–	–	–	+4	–	+4
Исследуемый образец I	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	–	+4
Исследуемый образец II	–	–	–	+4	+4	+4	+4	–	+4
K [–] РТГА	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	–	+4
Контроль рабочего разведения диагностикума КЭ				+4	+4	+4	–		
				+4	+4	+4	–		
				+4	+4	+4	–		
Контроль эритроцитов	–	–	–						

Учет результатов в РСК.

Результаты РСК (опыта линейного титрования) учитывают по 4-крестовой системе, если наблюдаются следующие результаты в контрольных лунках:

- полная задержка гемолиза в лунках контроля гемсистемы, а также контроля диагностикума КЭ на гемотоксичность;
- полный гемолиз в лунках контролей на антикомплемментарность исследуемых образцов, контрольных образцов и диагностикума КЭ;
- в контроле доз комплемента (см. Таблицу 7) результаты соответствуют вариантам III или IV (т.е. рабочее разведение, использованное в реакции, содержит 1,5 ед. комплемента).

Таблица 7

Пример учета результатов РСК
в зависимости от результатов контроля доз комплемента

Варианты результатов контроля	Разведение комплемента, в ед.				Примечание
	2	1,5	1	0,5	
I	–	–	–	–; +1	Опыт не учитывают
II	–	–	–	+2; +3; +4	Опыт не учитывают
III	–	–; +1	+2; +3; +4	+2; +3; +4	Опыт учитывают
IV	–	+2; +3; +4	+2; +3; +4	+4	Опыт учитывают

За титр исследуемого или контрольного образца при использовании 4 КСЕ диагностикума КЭ принимают его максимальное разведение, давшее интенсивную задержку гемолиза не менее чем на +3.

Реакцию считают специфичной, если диагностикум КЭ не выявляет антитела в К⁻ РСК, а в опыте с К⁺ РСК и в контроле 4 КСЕ диагностикума КЭ выявлены титры этих контрольных образцов, соответственно указанным на ампулах (этикетках), или отличающиеся от них не более чем на одно разведение.

В примере (Таблица 8) результаты опыта учитывают, так как по результатам контроля доз комплемента в реакции использовано 1,5 ед. комплемента, титр исследуемого образца I – 0, титр исследуемого образца II – 1:16, подтверждены титры К⁺ РСК – 1:64 и диагностикума КЭ – 1:32, в К⁻ РСК антитела не выявлены. Реакция специфична.

Диагностическим считают нарастание титра антител в парных исследуемых образцах в 4 раза и больше.

Исследуемые образцы, в которых по результатам контроля обнаружена антикомплементарность, обрабатывают одним из способов:

а) прогревают при температуре на 1-2 °С выше необходимой (см. раздел «АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ»);

б) замораживают при температуре минус (15-20) °С, оттаивают, осадок удаляют центрифугированием при 2000-2500 об/мин в течение 25-30 мин.

Затем РСК повторяют с обработанным образцом. При неудовлетворительных результатах повторного контроля данный образец не пригоден для испытания в РСК.

Таблица 8

*Результаты титрования исследуемых и контрольных образцов
(примерный протокол РСК)*

Ингредиенты	Разведения ингредиентов	Диагностикум КЭ рабочее разведение	Контроль на антикомплементарность				Контроль 4 КСЕ диагностикума КЭ (разведения диагностикума КЭ)				Контроль доз комплемента	Контроль гем-системы
			Исследуемый	Исследуемый	К ⁺ РСК	К ⁻ РСК	1:8	1:16	1:32	1:64		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Исследуемый образец I	1:4	+2	—									
	1:8	+2										
	1:16	—										
	1:32	—										
Исследуемый образец II	1:8	+4		—								
	1:16	+4										
	1:32	+2										
	1:64	+2										

K ⁺ РСК	1:16	+4			–		+4	+4	+4	+2		
	1:32	+4										
	1:64	+4										
	1:128	–										
K [–] РСК	1:8	–				–						
	1:16	–										
Контроль диагностики на антикомплементажность		–										
Контроль диагностики на гемотоксичность		+4										
Комплемент	2 ед										–	
	1,5 ед										–	
	1 ед										+2	
	0,5 ед										+4	
Гемсистема												+4

Учет результатов в РРГ.

Результаты учитывают визуально, просматривая чашки Петри в проходящем свете при снятой крышке. Положительный результат, свидетельствующий о наличии специфических антител в исследуемых образцах и положительном контрольном образце – прозрачная зона гемолиза диаметром не менее 4 мм вокруг лунки, в центре которой иногда остаются нелизированные эритроциты. Отрицательный результат – полное отсутствие зоны гемолиза вокруг лунки с сывороткой.

Реакцию считают специфичной, если в основном опыте K⁺ РСК дает положительный результат, K[–] РСК – отрицательный. При этом в контрольном опыте с несенсибилизированными эритроцитами гемолиза быть не должно. Причиной неспецифического гемолиза может быть обсемененность исследуемых образцов, для исследования таких образцов рекомендуется добавлять в них 1 % раствор борной кислоты в количестве 1-2 капли на 2-4 мл сыворотки.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ИЗДЕЛИЯ

Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Хранение изделия в упаковке изготовителя должно производиться в течение всего срока годности при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Хранение компонентов после вскрытия см. раздел «СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ».

Срок годности – 3 года со дня приемки. Изделие с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Рекламации по вопросам, касающимся качества и обращения медицинского изделия в течение срока годности, с обязательным указанием номера серии и срока годности следует направлять в адрес Акционерного общества «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» (АО «НПО «Микроген»): Россия, 115088, г. Москва, 1-я Дубровская ул., д. 15, строение 2, тел. (495) 710-37-87, e-mail: info@microgen.ru и в адрес производства: Россия, 634040, Томская область, г. Томск, ул. Ивановского, д. 8, тел. (3822) 63-37-34.

Взамен инструкции утвержденной 25.04. 2018 г.

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью
27 листа(ов)




Начальник
Управления регистрации
и медицинских исследований
АО «НПО «МИКРОГЕН»
А. Е. Ершов