

УТВЕРЖДАЮ

Главный
санитарный врач
Российской Федерации



«05»

10

№ 01-11/153-09

**ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-Анти-ВКЭ-Г»**

**Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса G к
вирусу клещевого энцефалита**

Состав набора:

Иммуносорбент — рекомбинантный белок, воспроизводящий иммунодоминантный фрагмент аминокислотной последовательности белка gE вируса клещевого энцефалита, сорбированный на стрипах планшета полистиролового 96-луночного разборного;

Конъюгат (концентрат х 21), жидкий — моноклональные антитела мыши к иммуноглобулину G человека, конъюгированные с пероксидазой хрена;

К+ - контрольный положительный образец, жидкий - сыворотка крови человека, инактивированная, содержащая антитела класса G к ВКЭ, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С;

К- - контрольный отрицательный образец, жидкий - сыворотка крови человека, инактивированная, не содержащая антитела к ВКЭ, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С;

БР - блок-раствор для рабочего разведения исследуемых сывороток;

РРК - раствор для разведения конъюгата;

ПР (концентрат х 25) - промывочный раствор;

СБ - субстратный буферный раствор;

Взамен инструкции № 01-11/112-07 от 26.06.2007 г.

ТМБ – хромоген – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, жидкий;

Стоп-реагент – водный раствор серной кислоты 0,75 моль/л.

Набор рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора.

Описание реагентов набора:

Иммуносорбент – разборный 96-луночный полистироловый планшет с прозрачными бесцветными лунками;

Конъюгат (концентрат х 21) - прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость;

К+ (контрольный положительный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость;

К- (контрольный отрицательный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая зелёного цвета жидкость;

БР - прозрачная или слегка опалесцирующая фиолетово-синего цвета жидкость; допустимо образование осадка;

РРК - прозрачная или слегка опалесцирующая жёлтого цвета жидкость; допустимо образование осадка;

ПР (концентрат х 25) - прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании;

СБ - прозрачная бесцветная жидкость;

ТМБ - прозрачная бесцветная жидкость;

Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость.

Назначение

Набор предназначен для выявления антител класса G к вирусу клещевого энцефалита в сыворотке (плазме) крови человека и определение их титра.

Меры безопасности

Для изготовления контрольных образцов набора использованы термоинактивированные сыворотки. При работе с набором в лаборатории с исследуемыми образцами сывороток (плазмы) крови человека обращаться, как с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, в спецодежде, не пипетировать ртом. Твёрдые отходы (использованные планшеты, наконечники к пипеткам, флаконы из-под реагентов, лабораторную посуду и т.д.) обеззараживать погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства (СМС) или в 3 % раствор хлорамина Б, или иного разрешенного к применению дез. средства. Длительность дезактивации - не менее 1 ч. Твёрдые отходы можно обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывные воды) обезвреживать добавлением сухого хлорамина Б из расчёта 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа) и температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.

Способ применения

Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока их годности!

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при температуре от 18 до 24 °С. Внимание! Иммуносорбент необходимо выдержать в закрытом пакете во избежание конденсации влаги в лунках планшета.

Все растворы необходимо отбирать новыми одноразовыми наконечниками, не допускать касания жидкости в наконечнике краем дозатора!

Для отбора проб использовать калиброванные пипетки переменного объема (одно- и многоканальные) с погрешностью измерения не более 5 %.

Посуду для работы с субстратной смесью (ванночки, флаконы и т.д.) перед использованием рекомендуется промыть водой дистиллированной, в случае повторного использования необходимо сразу после работы промыть 70 % раствором этилового спирта, а затем водой дистиллированной.

1. Перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых для постановки ИФА.

1. Фотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения с настройкой «по воздуху».
2. Пипетки переменного объема (одно- и многоканальные).
3. Наконечники одноразовые для пипеток переменного объема.
4. Термостат.
5. Вошер (промывочное устройство для промывки планшета).
6. Вода дистиллированная.
7. Бумага фильтровальная лабораторная.
8. Перчатки медицинские.

2. Приготовление рабочих растворов.

Объемы реагентов для проведения анализа на необходимом количестве стрипов или на целом планшете приведены в таблице 1.

Таблица 1

Расход реагентов тест-системы в зависимости от количества используемых стрипов при постановке ИФА

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц. х 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. х 21) (мл)	РРК (мл)	СБ (мл)	ТМБ (мл)
1	4,0	96,0	0,05	1,0	1,0	0,1
2	8,0	192,0	0,10	2,0	2,0	0,2
3	12,0	288,0	0,15	3,0	3,0	0,3
4	16,0	384,0	0,20	4,0	4,0	0,4
5	20,0	480,0	0,25	5,0	5,0	0,5
6	24,0	576,0	0,30	6,0	6,0	0,6
7	28,0	672,0	0,35	7,0	7,0	0,7
8	32,0	768,0	0,40	8,0	8,0	0,8

9	36,0	864,0	0,45	9,0	9,0	0,9
10	40,0	960,0	0,50	10,0	10,0	1,0
11	44,0	1056,0	0,55	11,0	11,0	1,1
12	50,0	1200,0	0,65	13,0	12,0	1,2

ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимое количество концентрата промывочного раствора отобрать в отдельную ёмкость и добавить соответствующее количество воды дистиллированной (согласно табл. № 1 и 2). Полученный рабочий раствор тщательно перемешать.

Хранение: рабочий промывочный раствор хранить не более 3-х сут при температуре от 2 до 8 °С.

К+ - контрольный положительный образец, готов к применению.

К- - контрольный отрицательный образец, готов к применению.

БР - блок-раствор для рабочего разведения исследуемых образцов, готов к применению. Перед использованием БР тщательно перемешать и отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

РРК - раствор для разведения конъюгата, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать и отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

Конъюгат, рабочий раствор, готовить перед использованием. Необходимое количество РРК перенести в чистую ёмкость, добавить соответствующее количество тщательно перемешанного концентрата конъюгата (согласно табл. № 1 и 2) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!).

Хранение: рабочий раствор конъюгата стабилен не более 12 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С при хранении в чистых флаконах.

ТМБ - хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин для приготовления субстратной смеси, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

СБ - субстратный буферный раствор для приготовления субстратной смеси, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

СС - субстратная смесь, готовить перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (согласно табл. № 1 и 2), тщательно перемешать до полного растворения.

Хранение: допустимо хранение СС не более 10 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в чистых флаконах.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

Стоп – реагент - готов к применению.

3. Подготовка исследуемых образцов.

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить не более 3-х сут при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Образцы с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией могут дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

4. Проведение ИФА.

4.1. Вскрыть фольгированный пакет с иммуносорбентом, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов. Пакет с

неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

Перед использованием иммуносорбент не промывать!

4.2. При внесении контрольных образцов в зависимости от количества используемых стрипов рекомендуется следующая схема:

1 или 2 стрипа - 1 лунка К+, 2 лунки К-;

3 стрипа и более - 2 лунки К+, 3 лунки К-.

Например, при постановке ИФА на двух стрипах: в лунку стрипа А1 пипеткой переменного объема внести 100 мкл К+, в 2 лунки В1 и С1 - по 100 мкл К-. В остальные лунки внести по 80 мкл БР и по 20 мкл образцов исследуемых сывороток (конечное разведение сывороток - 1:5).

Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием, планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате в течение 1 ч при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

4.3. Содержимое лунок удалить в ёмкость с дезинфицирующим раствором (аккуратно, с помощью вошера или многоканальной пипетки) и планшет промыть 5 раз рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдерживая 40 сек и удаляя промывочный раствор в ёмкость с дезинфицирующим раствором.

4.4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

4.5. Содержимое лунок удалить в ёмкость с дезинфицирующим раствором (аккуратно, с использованием промывочного устройства или многоканальной пипетки) и планшет промыть 5 раз рабочим ПР, как в п. 4.3.

4.6. Во все лунки планшета внести по 100 мкл СС и выдержать 30 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

4.7. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и провести учет результатов.

5. Учёт результатов.

Учет результатов провести спектрофотометрически при двух длинах волн - 450 нм и при референс-длине волны в диапазоне от 620 до 680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм. Реакцию следует учитывать, если значения оптической плотности (ОП) в лунках с К+ - не менее 0,6, а среднее значение ОП К- - не более 0,2.*

* Значения ОП К- и исследуемых образцов сывороток ниже 0,00 (со знаком «-») при расчетах ОП крит. и анализе результатов считать равными нулю.

ОП критическое (ОП крит.) рассчитывать по формуле:

ОП крит. = ср. знач. ОП К- + А, где А - коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе, величину которого указывают для каждой серии в инструкции по применению, вкладываемой в коробку с набором, и в паспорте на серию данного препарата.

Результаты анализа сывороток считать положительными, если значение ОП исследуемого образца выше $1,1 \times \text{ОП крит.}$

Результаты анализа сывороток считать отрицательными, если значение ОП исследуемого образца ниже $0,9 \times \text{ОП крит.}$

Если значение ОП исследуемого образца превышает $0,9 \times \text{ОП крит.}$, но меньше значения $1,1 \times \text{ОП крит.}$, этот образец считать неопределенным. В этом случае необходимо повторное исследование сыворотки крови пациента на антитела к ВКЭ в динамике – через 1-2 недели после первого забора крови. Желательно, чтобы повторно взятый образец анализировался с предыдущим (парные сыворотки), что позволит с большей достоверностью оценить динамику специфических антител.

6. Набор реагентов «ДС-ИФА-Анти-ВКЭ-Г» можно использовать для определения титра антител класса G в положительных образцах сывороток (плазм) крови человека.

За минимальный титр принято рабочее разведение исследуемого образца (1:5). Предусмотрено 2 способа определения титра антител в сыворотке (плазме) крови человека.

Способ 1. Раститровка образца сыворотки по вертикальному ряду (стрипу).

Для титрования образца в лунку A2 иммуносорбента внести 160 мкл БР, в лунки B2-H2 – по 100 мкл БР. Затем в лунку A2 добавить 40 мкл образца сыворотки крови, тщательно перемешать осторожным пипетированием. После этого перенести 100 мкл разведенного образца из лунки A2 в лунку B2, также тщательно перемешивая пипетированием. Процедуру повторить до конца вертикального ряда, включая лунку H2. После перемешивания 100 мкл содержимого лунки H2 отобрать и сбросить в емкость для сбора инфицированного материала. Таким образом, в вертикальном ряду получают последовательные двукратные разведения образца от 1:5 до 1:640. Последующие операции выполнять в соответствии с п. 4 данной инструкции по применению тест-системы. За титр антител к ВКЭ принимать максимальное разведение образца, при котором регистрируется положительный результат.

Способ 2. Определение титра проводят с помощью расчета коэффициента позитивности (КП).

Для определения титра антител необходимо рассчитать коэффициент позитивности (КП) по формуле:

$$\text{КП} = \text{ОП об.} / \text{ОП крит.}$$

Титр антител класса G к ВКЭ в исследуемом образце определить по таблице соответствия величины КП титру антител к ВКЭ (таблица 2).

Таблица 2

Соответствие величин КП титрам антител к ВКЭ

Значения КП	Титр антител
От 1,1 до 2,5	1/5

От 2,6 до 4,0	1/10
От 4,1 до 8,0	1/20
От 8,1 до 10,0	1/40

Пример. ОП сыворотки, разведённой в 5 раз – 0,850

ОП крит. = 0,22; КП = $0,850/0,22 = 3,86$;

По таблице соответствия КП титрам антител определяем титр антител. Величине КП, равной 3,86, соответствует титр 1/10.

Если значение КП исследуемого образца превышает 10, то такой образец необходимо предварительно развести рабочим ПР (в 8 раз – если $10,1 < \text{КП} < 12$; в 16 раз – если $\text{КП} > 12$) и вновь провести анализ согласно инструкции по применению тест-системы. Затем следует вычислить значение КП разведенного образца и по таблице № 3 определить соответствующий титр. Окончательный показатель титра вычислить, умножив полученное значение на коэффициент предварительного разведения (8 или 16).

Показатели титра, определяемые двумя разными способами, не должны отличаться более, чем в два раза.

При одновременной постановке “парных” сывороток на одном иммуносорбенте (наборе одной серии) достоверным считать изменение (снижение или увеличение) показателя титра антител в 2 раза. При постановке сывороток в динамике на разных иммуносорбентах (особенно с наборами разных серий) достоверным считать изменение (снижение или увеличение) показателя титра не менее, чем в 4 раза.

Необходимо учитывать, что титр антител одного и того же образца сыворотки (плазмы) крови в тест-системах разных производителей может быть различным. Поэтому исследование сыворотки крови одного больного в динамике должно проводиться только в тест-системе одного производителя.

Форма выпуска

Иммуносорбент	1 шт.
Конъюгат (концентрат х 21)	0,75 мл – 1 фл.
К+, инактивированный	1,5 мл – 1 фл.
К-, инактивированный	2,5 мл – 1 фл.

БР	12,5 мл – 1 фл.
РРК	13,5 мл – 1 фл.
ПР (концентрат х 25)	50,0 мл – 1 фл.
СБ	15,0 мл – 1 фл.
ТМБ	1,5 мл – 1 фл.
Стоп-реагент	25,0 мл – 1 фл.

Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают инструкцию по применению. Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетами или защитная пленка для ИФА планшетов;
- одноразовые наконечники;
- пластиковая ванночка для жидких реагентов;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом.

Срок годности. Условия транспортирования и хранения

Срок годности набора – 12 месяцев.

По истечении срока годности препарат использованию не подлежит.

Транспортирование набора должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование от 9 до 20 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

Набор должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Условие отпуска – для диагностики «in vitro». Для лечебно-профилактических и санитарно- профилактических учреждений.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу 119002, Россия, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел.: (499) 241-39-22, факс: (499) 241-92-38 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно производственное

объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, Нижний Новгород, ул. Яблонева, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12, 8-800-555-0300.

E-mail: info@npods.nnov.ru; www.npods.ru.

**Директор по производству ООО
«Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»**



В. К. Пименов



Итого 10 у
12 (сверх нормы)
сформировано
Генерал