

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 200__ г. № _____

"УТВЕРЖДАЮ"
Президент ЗАО "ЗАО Лаб"

" 28 " _____ 2007 г.



**ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов**

"ИФА-ККГЛ-IgM"

**Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов
класса М к вирусу лихорадки Крымской-Конго геморрагической
лихорадки**

Регистрационное удостоверение № от "..." 200__ г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление иммуноглобулинов класса М к вирусу лихорадки Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) в сыворотке (плазме) крови человека.

СОСТАВ НАБОРА

Иммуносорбент – козьи антитела против иммуноглобулинов человека класса М, сорбированные в лунках 96-луночного разборного полистиролового плоскодонного планшета
2 шт.

K⁺ – контрольный положительный образец – сыворотка крови человека, содержащая иммуноглобулины класса М к вирусу ККГЛ, инаktivированная прогреванием при 56 °С в течение 2 ч; не содержит HBsAg, антитела к ВГС, HBsAg, ВИЧ-1,2, содержит мертиолят в конечной концентрации 0,01%; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость

1 флакон (0,1 мл).

K⁻ – контрольный отрицательный образец – сыворотка крови человека, не содержащая иммуноглобулины класса М к вирусу ККГЛ, инаktivированная прогреванием при 56 °С в течение 2 ч; не содержит HBsAg, антитела к ВГС, HBsAg, ВИЧ-1,2, содержит мертиолят в конечной концентрации 0,01%; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость

1 флакон (0,1 мл).

AГ_{ККГЛ} – антиген вируса ККГЛ – препарат неочищенного антигена вируса ККГЛ, инаktivированный 0,004% бетапротиолактоном; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость

1 флакон (0,12 мл).

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

Г.Г. Онищенко
" " 200_ г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

"ИФА-ККГЛ-IgM"

**Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов
класса М к вирусу лихорадки Крымской-Конго геморрагической
лихорадки**

Регистрационное удостоверение № от "..." 200_ г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление иммуноглобулинов класса М к вирусу лихорадки Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) в сыворотке (плазме) крови человека.

СОСТАВ НАБОРА

Иммуносорбент – козьи антитела против иммуноглобулинов человека класса М, сорбированные в лунках 96-луночного разборного полистиролового плоскодонного планшета
2 шт.

K⁺ – контрольный положительный образец – сыворотка крови человека, содержащая иммуноглобулины класса М к вирусу ККГЛ, инаktivированная прогреванием при 56 °С в течение 2 ч; не содержит HBsAg, антитела к ВГС, HBsAg, ВИЧ-1,2, содержит мертиолят в конечной концентрации 0,01%; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость

1 флакон (0,1 мл).

K⁻ – контрольный отрицательный образец – сыворотка крови человека, не содержащая иммуноглобулины класса М к вирусу ККГЛ, инаktivированная прогреванием при 56 °С в течение 2 ч; не содержит HBsAg, антитела к ВГС, HBsAg, ВИЧ-1,2, содержит мертиолят в конечной концентрации 0,01%; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость

1 флакон (0,1 мл).

АГ_{ККГЛ} – антиген вируса ККГЛ – препарат неочищенного антигена вируса ККГЛ, инаktivированный 0,004% бетапротиолактоном; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость

1 флакон (0,12 мл).

АГ_N – антиген нормальный – препарат антигена из ткани мозга интактных белых мышей-сосунков; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость

1 флакон (0,12 мл).

Конъюгат – антитела к вирусу ККГЛ, полученные из асцитной жидкости мышей, иммунизированных вирусом ККГЛ, меченные пероксидазой хрена; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость

1 флакон (0,5 мл).

РБР(х10) – 10-кратный концентрат раствора для разведения образцов – концентрат раствора для разведения исследуемых образцов, антигенов, конъюгата; прозрачная красного цвета жидкость

1 флакон (10 мл)

ФСБ-Т(х25) – 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – концентрат раствора для промывания планшетов; слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37°C в течение 30 мин

1 флакон (80 мл).

ТМБ – хромоген – 0,25 % раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина; прозрачная бесцветная жидкость

1 флакон (1,5 мл).

ЦР – цитратный раствор – раствор для приготовления субстратно-индикаторного раствора; прозрачная бесцветная жидкость

2 флакона (по 12 мл).

Стоп-реагент – серная кислота в концентрации 0,5 моль/л; прозрачная бесцветная жидкость

1 флакон (25 мл).

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемом образце иммуноглобулинов класса М к вирусу ККГЛ, иммуноглобулины связываются с козьими антителами к иммуноглобулинам человека класса М, сорбированными в лунках планшета. При последующем добавлении в лунки АГ_{ККГЛ}, он связывается с антителами класса М к вирусу ККГЛ. Образующийся при этом комплекс связывается затем с конъюгатом – антителами к вирусу ККГЛ, меченными пероксидазой хрена, и выявляется в реакции с индикаторным раствором, содержащим хромоген – тетраметилбензидин, в результате которой меняется цвет (оптическая плотность) реакционной смеси в лунке планшета; изменение регистрируется спектрофотометрически.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Набор рассчитан на проведение 96 определений, включая контрольные.

Предусмотрена возможность дробного использования набора.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор "ИФА-ККГЛ-IgM" является биологически безопасным, т.к. антиген вируса ККГЛ полностью инактивирован. Однако при обследовании полевых и клинических мате риа-

лов необходимо соблюдать меры предосторожности и обращаться с ними как с материалами, потенциально инфицированными вирусом, в соответствии с требованиями СП 1.3.1285-03 "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)".

- Работать в резиновых (латексных) перчатках.
- Не пипетировать ртом.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

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

Перед использованием все реагенты набора необходимо выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Достоверность результатов зависит от строгого выполнения следующих правил:

- Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.
- Сразу после постановки реакции плотно закрытые флаконы с исходными реагентами необходимо поместить в холодильник (при температуре от 2 до 8 °С), использовать в течение 1 мес.
- Растворы хромогена и конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Исключить воздействие света на раствор хромогена.
- При промывке планшета лунки заполнять полностью (370 мкл промывочного раствора) и не касаться лунок наконечниками пипетки.
- Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.
- Наконечники для пипеток, используемые для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами использовать однократно.
- Для отбора исследуемых образцов и реагентов тест-системы использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Оборудование и материалы

– Дозаторы (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 %.

– Автоматические промыватели или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

– Термостат на 37 °С.

– Спектрофотометр.

- Перчатки резиновые или латексные.
- Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

Анализируемые образцы

Реакцию проводят с сывороткой или плазмой крови, инаktivированной прогреванием при температуре 56°C в течение 1 ч.

Забор крови должен быть произведен согласно стандартной процедуре.

Образцы можно хранить:

при температуре от 2 до 8 °C в течение одной недели при условии отсутствия микробной контаминации;

при температуре минус 20 °C или более низкой температуре в течение 6 мес.

Образцы могут подвергаться замораживанию/оттаиванию только однократно. После размораживания образцы тщательно перемешивать.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом должны быть очищены центрифугированием в течение 5 мин при 5-10 тыс. об/мин.

Не использовать образцы с повышенным содержанием липидов и с признаками гемолиза или бактериального пророста.

Подготовка рабочих растворов и реагентов для ИФА

Все реагенты до начала анализа выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °C

Приготовление рабочего промывающего раствора (ФСБ-Т)

ФСБ-Т(х25) интенсивно перемешать (в случае выпадения осадка – прогреть при температуре 37 °C в течение 30 мин до полного растворения солей), развести водой очищенной в соотношении 1:25. В зависимости от числа используемых стрипов, отобрать необходимое количество концентрата и довести водой очищенной до объема, указанного в табл. 1.

Таблица 1

Реагент	Объем реагента (мл) на...стрипов					
	2	4	6	8	10	12
ФСБ-Т(х25)	7	13	20	27	33	40
Вода очищенная	до 175	до 325	до 500	до 657	до 825	до 1000

Приготовление рабочего разводящего буферного раствора (РБР)

РБР(х10) развести в 10 раз водой очищенной (1,0 мл концентрата на 9,0 мл воды).

Раствор хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 1 сут.

Подготовка исследуемых образцов

10 мкл образца внести в 190 мкл РБР (разведение 1:20), тщательно перемешать пипетированием.

Разведенные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

Приготовление рабочих разведений АГ_{ККГЛ} и АГ_Н

Готовить за 10 мин до внесения в лунки.

Развести антигены в РБР в соотношении 1:100.

При использовании определенного количества стрипов необходимый объем РБР перенести в чистую емкость (желательно одноразовую) и добавить АГ_{ККГЛ} (АГ_Н, соответственно) в количестве, указанном в табл. 2

Таблица 2

Реагент	Объем реагента на...стрипов					
	1	2	3	4	5	6
РБР, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
Антиген, мкл	10	20	30	40	50	60

Разведенные антигены хранению не подлежат.

Приготовление рабочего разведения конъюгата

Готовить не более чем за 10 минут до использования!

При постановке на целом планшете к 6 мл РБР добавить 120 мкл конъюгата; тщательно перемешать.

При использовании меньшего количества стрипов необходимый объем РБР перенести в чистую емкость (желательно одноразовую) и добавить конъюгат в количестве, указанном в табл. 3.

Таблица 3

Реагент	Объем реагента на...стрипов					
	2	4	6	8	10	12
РБР(мл)	2,0	4,0	6,0	8,0	10	12
Конъюгат (мкл)	40	80	120	160	200	240

Раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 ч.

Приготовление субстратно-индикаторного раствора

Готовить непосредственно перед использованием в защищенном от прямого солнечного света месте.

При исследовании на целом планшете во флакон с ЦР добавить 600 мкл ТМБ.

При постановке на меньшем числе стрипов необходимый объем ЦР перенести в чистую (желательно одноразовую) емкость и добавить ТМБ в количестве, указанном в табл. 4.

Таблица 4

Реагент	Объем реагента на...стрипов					
	2	4	6	8	10	12
ЦР, мл	2,0	4,0	6,0	8,0	10	12
ТМБ, мкл	100	200	300	400	500	600

Раствор хранению не подлежит.

Иммуносорбент, K^+ , K^- , стоп-реагент готовы к использованию.

Проведение ИФА

Извлечь из пакета планшет или необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в плотно закрытом пакете не более 1 мес.

Лунки A1 и A2 оставить пустыми для измерения уровня "бланк" (оптический нуль фотометра), в остальные внести по 90 мкл РБР.

Затем в лунки B1, B2 внести по 10 мкл K^+ , в лунки C1, C2 – по 10 мкл K^- , в остальные лунки, в которые было внесено по 90 мкл РБР, внести по 10 мкл исследуемых образцов. Каждый образец добавить в 2 лунки (1 лунка – в четном ряду, 1 лунка – в нечетном). Содержимое лунок перемешать пипетированием при внесении образцов.

Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать 2 ч в термостате при температуре 37°C.

С помощью промывающего устройства удалить содержимое лунок в контейнер с дезраствором. В каждую лунку внести ФСБ-Т, заполняя ее до краев (необходимо вносить не менее 370 мкл раствора), процедуру промывки выполнить 3 раза. По окончании промывки удалить влагу из лунок, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

В нечетные вертикальные ряды планшета (1, 3, 5, 7, 9, 11) внести по 100 мкл рабочего разведения АГ_{КГЛ}. В четные ряды планшета (2, 4, 6, 8, 10, 12) внести по 100 мкл рабочего разведения АГ_Н.

Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать 60 мин при температуре 37°C.

С помощью промывающего устройства удалить содержимое лунок в контейнер с дезраствором и 3 раза промыть планшет ФСБ-Т, как описано выше.

Во все лунки планшета, кроме лунок A1 и A2 внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата. Планшет закрыть крышкой и инкубировать 60 мин при температуре 37°C.

6 раз промыть планшет, как указано выше.

В каждую лунку планшета внести по 100 мкл свежеприготовленного субстратно-индикаторного раствора. Планшет поместить в защищенное от света место при комнатной температуре на 5 мин. Планшет крышкой не закрывать.

В каждую лунку внести по 100 мкл стоп-реагента и сразу же учесть результаты реакции.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически немедленно после остановки реакции, измеряя оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм. В качестве уровня "бланк" (оптический нуль фотометра) используют ОП содержимого лунки А1.

Результаты ИФА учитывать при следующих условиях:

ОП в лунке А2 – не более 0,2;

ОП K^+ в лунке с АГ_{ККГЛ} – не менее 0,6;

ОП K^+ в лунке с АГ_N – не более 0,2;

ОП K^- в лунках с АГ_{ККГЛ} и с АГ_N – не более 0,2.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Образцы считаются положительными, т.е. содержат IgM к вирусу ККГЛ, если ОП в лунке с АГ_{ККГЛ} составляет не менее 0,3.

Исследуемые образцы считаются отрицательными, т.е. не содержат IgM к вирусу ККГЛ, если ОП в лунке с АГ_{ККГЛ} и в лунке с АГ_N составляет не более 0,2.

Образцы, для которых ОП составила 0,2-0,3, считаются сомнительными. Их исследование необходимо повторить.

В случае необходимости определения титра IgM к вирусу ККГЛ готовится ряд двукратных разведений образца в РБР. Разведения от 1:100 до 1:3200 исследуются в ИФА, как указано выше. Титром IgM к вирусу ККГЛ считается максимальное разведение, в котором получены положительные результаты.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 6 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение - в упаковке предприятия-изготовителя в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Транспортирование - в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 72 ч. На дальние расстояния - только авиатранспортом.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1. ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК и в ФГУН ГИСК им.

Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора по адресу: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек 41, тел. (495) 241-3922.

Президент ЗАО "ЭКОлаб"



Г.Марданлы

Руководитель Гос.испытаний заведующая лабораторией СиК МИБП против арбовирусных инфекций, риккетсиозов и СПИД ФГУН "ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора" профессор

Ворова

М.С.Воробьева