

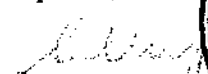
УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г. № _____

"УТВЕРЖДАЮ"

Президент ЗАО "ЭКОлаб"


" 20 " 11 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

"ИФА-ККГЛ-антиген"

Тест-система иммуноферментная для выявления антигена вируса
Крымской - Конго геморрагической лихорадки

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление антигена вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) в полевых и клинических материалах: иксодовых клещах, спинно-мозговой жидкости (СМЖ) и в тканях органов погибших людей.

СОСТАВ НАБОРА

Иммуносорбент – мышинные антитела класса G к вирусу ККГЛ ($IgG_{ККГЛ}$) и нормальный мышинный иммуноглобулин класса G (IgG_N), сорбированные на поверхности лунок 96-луночного разборного полистиролового плоскодонного планшета. $IgG_{ККГЛ}$ сорбированы в нечетных рядах лунок, IgG_N – в четных рядах 2 шт.

K^+ – контрольный положительный образец – антиген вируса ККГЛ, инактивированный 0,004% бетапропиолактоном; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость 1 флакон (0,1 мл).

K^- – контрольный отрицательный образец – нормальный антиген, приготовленный из ткани мозга неинфицированных мышей; инактивированный 0,004% бетапропиолактоном; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость 1 флакон (0,1 мл).

Конъюгат – антитела к вирусу ККГЛ, полученные из асцитной жидкости мышей, инфицированных вирусом ККГЛ, меченые пероксидазой хрена; жидкий, готовый для использования; 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).

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

_____ Г.Г. Онищенко
" " _____ 200_ г.
№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
"ИФА-ККГЛ-антиген"

Тест-система иммуноферментная для выявления антигена вируса
Крымской - Конго геморрагической лихорадки

Регистрационное удостоверение № от " " 200_ г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление антигена вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) в полевых и клинических материалах: иксодовых клещах, спинно-мозговой жидкости (СМЖ) и в тканях органов погибших людей.

СОСТАВ НАБОРА

Иммуносорбент – мышинные антитела класса G к вирусу ККГЛ ($IgG_{\text{ККГЛ}}$) и нормальный мышинный иммуноглобулин класса G (IgG_N), сорбированные на поверхности лунок 96-луночного разборного полистиролового плоскодонного планшета. $IgG_{\text{ККГЛ}}$ сорбированы в нечетных рядах лунок, IgG_N – в четных рядах 2 шт.

K^+ – контрольный положительный образец – антиген вируса ККГЛ, инаktivированный 0,004% бетапропиолактоном; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость 1 флакон (0,1 мл).

K^- – контрольный отрицательный образец – нормальный антиген, приготовленный из ткани мозга неинфицированных мышей; инаktivированный 0,004% бетапропиолактоном; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость 1 флакон (0,1 мл).

Конъюгат – антитела к вирусу ККГЛ, полученные из асцитной жидкости мышей, инфицированных вирусом ККГЛ, меченые пероксидазой хрена; жидкий, готовый для использования; 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).

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича
Роспотребнадзора

Белицкий Н.В.Медуницын

«29» _____ 2007г.



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 рабочего раствора хромогена 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 антигена вируса ККГЛ, антиген связывается с антителами класса G к вирусу ККГЛ, сорбированными в лунках планшета. Образующийся при этом комплекс (антитело-антиген) связывается затем с конъюгатом – мышиными 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.

Предусмотрено детальное использование набора.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор "ИФА-ККГЛ-антиген" является биологически безопасным, т.к. антиген вируса ККГЛ полностью инактивирован. Однако при обследовании полевых и клинических материалов 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 надосадочной жидкостью суспензий гомогенатов иксодовых клещей, тканей органов погибших людей, а также со спинно-мозговой жидкостью (СМЖ) больных людей.

Подготовка исследуемых образцов

Приготовление суспензии клещей

Поступивших клещей промывают однократно 70% раствором спирта, затем 0,9% раствором хлорида натрия с антибиотиками (1000 ед. пенициллина и 500 мг стрептомицина на 1 мл среды), раскладывают в пластиковые пробирки, типа Эппендорф, по 1 экземпляру, маркируют и погружают в жидкий азот до обследования.

Перед обследованием готовят суспензию, растирая замороженных клещей пестиком, добавляют на каждого клеща по 0,2 мл раствора для разведения образцов (РБР).

Напитавшихся клещей растирают в фарфоровых ступках пестиком и добавляют небольшое количество стеклянного песка.

Суспензии клещей центрифугируют 5 мин при 2 тыс. об/мин.

В ИФА обследуют надосадочную жидкость.

Приготовление суспензий из тканей органов погибших людей

Для исследования тканей органов погибших людей необходимо приготовить 1% суспензию на РБР. Суспензию центрифугируют при 3000-6000 об/мин в течение 20-30 мин, надосадочную жидкость переносят в стерильную пробирку, маркируют и исследуют немедленно.

Приготовление рабочего разведения спинно-мозговой жидкости (СМЖ)

СМЖ развести РБР в соотношении 1:10.

Пробы, подготовленные для ИФА, в случае необходимости, можно хранить в замороженном состоянии при температуре не выше минус 20 °С.

Подготовка рабочих растворов и реагентов для ИФА

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

Приготовление рабочего промывающего раствора (ФСБ-Т)

ФСБ-Т(х25) интенсивно перемешать (в случае выпадения осадка – прогреть при температуре 37 °С 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 °С не более 1 сут.

Приготовление рабочего разведения конъюгата

Готовить не более чем за 10 мин до использования!

При постановке на целом планшете к 12 мл РБР добавить 240 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. 2.

Таблица 2

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.3.

Таблица 3

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 при температуре от 2 до 8 °С.

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

В лунки В1, В2 внести по 10 мкл K^+ , в лунки С1, С2 – по 10 мкл K^- , в остальные лунки, кроме А1 и А2, внести по 10 мкл исследуемых образцов. Каждый образец вносить в 2 лунки (1 лунка – в четном ряду (IgG_N), 1 лунка – в нечетном (IgG_{KKGL})).

Содержимое лунок перемешивать пипетированием при внесении образцов.

Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать 60 мин в термостате при температуре 37 °С.

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

Во все лунки планшета, кроме лунок А1 и А2, внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата. Планшет закрыть крышкой и выдержать при температуре 37 °С в течение 60 мин.

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 10 мин.

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" используют ОП содержимого лунки А1.

Результаты ИФА учитываются при следующих условиях:

ОП в лунке А2 – не более 0,2;

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

ОП K^+ в лунке с IgG_N – не более 0,2;

ОП K^- в лунках с IgG_{KKGL} и с IgG_N – не более 0,2.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Исследуемые образцы считаются положительными, т.е. содержат антиген вируса ККГЛ, если ОП в лунке с IgG_{KKGL} составляет не менее 0,3, а ОП в лунке с IgG_N – не более 0,2.

Исследуемые образцы считаются отрицательными, т.е. не содержат антигена вируса ККГЛ, если ОП в лунке с IgG_{KKGL} и в лунке с IgG_N составляет не более 0,2.

В случае необходимости определения титра антигена вируса ККГЛ готовится ряд двукратных разведений образца в РБР, каждое разведение исследуется, как указано выше. Титром антигена вируса 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, г. Москва, пер. Сивцев Вражек 41, тел. (495) 241-3922

Президент ЗАО "ЭКОлаб"



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

В.С. Воробьева

М.С.Воробьева