

"УТВЕРЖДАЮ"
Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"

"12" 12 2016 г.

В.Ю.Борисов

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Тест-система иммуноферментная для выявления антител
класса G к вирусу клещевого энцефалита»

«ИФА-КЭ-IgG»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса G к вирусу клещевого энцефалита» «ИФА-КЭ-IgG» предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита (КЭ) в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	разборный полистироловый планшет с плоским дном на 96 лунок, на поверхности которых сорбированы мышинные антитела класса G к вирусу клещевого энцефалита	1 планшет
Контрольный положительный образец (K ⁺)	прозрачная бесцветная жидкость.	1 фл. (0,15 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	прозрачная бесцветная жидкость.	1 фл. (0,15 мл)
Антиген вируса КЭ (АГ _{КЭ})	антиген вируса КЭ. Прозрачная жидкость с желтым оттенком различной интенсивности со слабой опалесценцией	1 фл. (0,07 мл)
Антиген нормальный (АГ _N)	антиген ткани мозга интактных белых мышей-сосунков. Прозрачная жидкость с желтым оттенком различной интенсивности со слабой опалесценцией	1 фл. (0,07 мл)
Конъюгат	моноклональные мышинные антитела против иммуноглобулинов человека класса G, меченные пероксидазой хрена; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 фл. (0,25мл)
Разводящий буферный раствор [РБР(x10)]	концентрат раствора для разведения образцов, антигена и конъюгата; непрозрачная, вязкая жидкость красного цвета.	1 фл. (5 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	1 фл. (40 мл)
Раствор индикаторный (РИ)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (12,5 мл)

Примечания. 1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(х25), РИ, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование разных серий этих реагентов или их смешение.

Набор укомплектован принадлежностями:

вспомогательным планшетом для предварительного разведения образцов (1 шт.),
вспомогательными пластиковыми емкостями размером 100х50х19 мм (4 шт.),
одноразовыми наконечниками для автоматических пипеток на 0,5-200 мкл (16 шт.),
клеякой пленкой для планшетов размером 85х135 мм (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации набора позволяет одномоментное парное исследование 48 образцов, включая контрольные (по 2 лунки в парных стрипах). Предусмотрена возможность проведения раздельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	2	4	6	8	10	12
Число иссл.образцов, включая контрольные	8	16	24	32	40	До 48

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Исследуемую сыворотку (плазму) вносят в лунки иммуносорбента после сорбции в них антигена КЭ (АГ_{КЭ}) и нормального антигена (АГ_Н).

При наличии в исследуемом образце антител класса IgG к вирусу клещевого энцефалита (КЭ) они связываются с комплексом (мышинные антитела к вирусу КЭ-антиген вируса КЭ), сорбированным в лунках планшета. Образующийся при этом комплекс, в свою очередь, связывается с конъюгатом - мышинными антителами к IgG человека, меченными пероксидазой хрена, и выявляется затем в цветной реакции с индикаторным раствором, содержащим хромоген – тетраметилбензидин, в результате которой меняется цвет (оптическая плотность) реакционной смеси в лунке планшета; изменение регистрируется спектрофотометрически.

Все исследуемые и контрольные образцы исследуются парно с АГ_{КЭ} и АГ_Н, который служит контролем специфичности реакции.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка (плазма) крови человека не менее 10 мкл.

Образцы сыворотки (плазмы) крови до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С и 3 мес при температуре минус 20 °С или более низкой. Допускается только однократное замораживание-размораживание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность определяется по стандартной панели положительных сывороток предприятия, (СОП⁺-098), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Аналитическая специфичность определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, (СОП⁻-098) как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%):

Сыворотка крови человека-99,00% - 100%,

Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%):
 Сыворотка крови человека - 99,07% - 100%,
 Плазма крови человека - 99,00% - 100%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» относится к классу А - отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными. Класс А – эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам (ТБО).

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

"РУЧНАЯ" ПОСТАНОВКА

Оборудование и материалы

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

Ручные, автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин.

Термостат на 37 °С, холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

1. Приготовление промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

При использовании всего планшета содержимое флакона с ФСБ-Т(х25) довести водой очищенной до 1 л.

При дробной постановке использовать соотношения объемов ФСБ-Т(х25) и воды, указанные в табл. 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1

Число стрипов	2	4	6	8	10
ФСБ-Т(х25), мл	7	13	20	27	33
Вода очищенная, мл	до 175	до 325	до 500	до 675	до 825

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

2. Приготовление разводящего буферного раствора (РБР)

РБР(х10) перед применением интенсивно встряхнуть. Далее 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 3 сут.

3. Приготовление рабочих разведений АГ_{кэ} и АГ_н

При постановке на целом планшете в двух чистых ёмкостях (желательно одноразовых) развести антигены в РБР в соотношении 1:100 (60 мкл концентрата антигена вносят в 6,0 мл РБР) При дробной постановке необходимый объем РБР перенести в две емкости и добавить АГ_{кэ} и 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

Рабочие разведения антигенов хранению не подлежат.

4. Приготовление рабочего разведения конъюгата

При постановке на целом планшете к 12 мл РБР добавить _____ мкл конъюгата; тщательно перемешать.

При дробной постановке необходимый объем РБР перенести в чистую емкость (желательно одноразовую) и добавить конъюгат в количестве, указанном в табл. 3

Таблица 3

Компонент	Объем компонента на ... стрипов					
	2	4	6	8	10	12
РБР, мл	2	4	6	8	10	12
Конъюгат, мкл	2хК	4хК	6хК	8хК	10хК	12хК

К= _____ мкл.

Примечание: Значение К указывается для каждой серии.

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

5. Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести 1:10 во вспомогательном планшете. Для этого внести в его лунки по 90 мкл РБР и добавить по 10 мкл сыворотки, тщательно перемешать пипетированием. Раствор хранить при температуре 2-8 °С не более 2 ч. Рабочее разведение (1:100) готовить непосредственно в лунках иммуносорбента (см. раздел Проведение ИФА ("ручная" постановка), п. 2).

6. Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, К⁺, К⁻, РИ, стоп-реагент – готовы к употреблению.

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА ("ручная" постановка)

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из упаковки рамку планшета и необходимое в соответствии со схемой постановки ИФА количество стрипов.

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

3. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой и инкубировать 60 мин при 37 °С в защищенном от света месте.

4. По окончании инкубации аспирировать содержимое лунок и 3 раза промыть лунки планшета ФСБ-Т, добавляя в каждую лунку не менее 400 мкл раствора. Время между заполнением и аспирацией должно быть не менее 30 сек.

Рекомендуется использовать:

- режим отмывки с переполнением – «overflow» - с внесением в лунки по 600-700 мкл рабочего промывочного раствора;

- поперечную аспирацию раствора из лунок – режим «crosswise».

Необходимо следить за полной аспирацией после каждого цикла отмывки (остаточный объем в лунках не должен превышать 10 мкл).

5. Внести во все лунки планшета по 90 мкл РБР. Затем в лунки А1, А2 внести по 10 мкл K^+ , в лунки В1, В2 – по 10 мкл K^- , в остальные лунки внести по 10 мкл исследуемых образцов, предварительно разведенных 1:10 в лунках вспомогательного планшета (см. раздел «Предварительное разведение исследуемых образцов»), тщательно перемешать пипетированием. Каждый образец исследуется парно в 2 лунках (1 лунка – в четном ряду, 1 лунка – в нечетном) (табл 4). Содержимое лунок перемешать пипетированием при внесении образцов.

Рекомендуемая схема внесения контрольных и исследуемых образцов.

Таблица 4

	1 АГ _{КЭ}	2 АГ _Н	3 АГ _{КЭ}	4 АГ _Н
А	К ⁺	К ⁺	№7	№7
В	К ⁻	К ⁻	№8	№8
С	№1	№1	№9	№9
Д	№2	№2	№10	№10
Е	№3	№3	№11	№11
Ф	№4	№4	№12	№12
Г	№5	№5	№13	№13
Н	№6	№6	№14	№14

6. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой и инкубировать 60 мин при 37 °С в защищенном от света месте.

7. С помощью промывателя удалить образцы из лунок, 3 раза промыть планшет ФСБ-Т, как указано в п. 4.

8. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата.

9. Планшет закрыть крышкой и инкубировать при 37 °С в течение 30 мин. в защищенном от света месте.

10. С помощью промывателя удалить образцы из лунок, 6 раз промыть планшет ФСБ-Т, как указано в п. 4.

11. Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора индикаторного (РИ), немедленно поместить планшет в защищенное от света место и выдержать 10-15 мин при температуре 18-25 °С.

12. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился индикаторный раствор) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и приступить к регистрации результатов (ОП реакционной смеси после внесения стоп-реагента стабильна не более 10 мин).

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм.

Результаты ИФА учитывать при следующих условиях:

ОП_К⁺ в лунке с АГ_Н – не более 0,25;

ОП_К⁻ в лунках с АГ_{КЭ} и с АГ_Н – не более 0,25.

В противном случае исследование необходимо повторить.

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

Исследуемые образцы считаются отрицательными, т.е. не содержат IgG к вирусу КЭ, если ОП в лунке с АГ_{КЭ} и в лунке с АГ_Н составляет не более 0,25.

Образцы, для которых ОП составила 0,25-0,3, считаются сомнительными. Их исследование необходимо повторить.

Полуколичественный учет результатов (определение титра антител)

Проводится только с образцами с положительным результатом качественного исследования.

В случае необходимости определения титра IgG к вирусу КЭ в исследуемой сыворотке готовится ряд двукратных разведений образца в РБР. Для этого в отдельном флаконе необходимо приготовить разведение исследуемого образца в РБР 1:100 (5 мкл образца + 500 мкл РБР). Титрование производится в рабочем планшете на этапе внесения образца с использованием двух стрипов.

В парные лунки ряда **А** вносят по 200 мкл рабочего разведения образца, в остальные (**В-Н** лунки) - по 100 мкл РБР и производят последовательное двукратное титрование, для чего по 100 мкл разведения 1:100 переносят в лунки **В**, перемешивают их содержимое пипетированием и по 100 мкл полученного разведения (1:200) переносят в лунки **С** перемешивают их содержимое пипетированием и повторяют указанную процедуру вплоть до получения в лунках **Н** разведения образца 1:12800; по 100 мкл последнего разведения из лунок **Н** удаляют.

Пример внесения указан в табл 5.

Таблица 5

Рекомендуемая схема титрования положительного образца

	АГ _{КЭ}	АГ _Н
А	1:100	
В	1:200	
С	1:400	
Д	1:800	
Е	1:1600	
Ф	1:3200	
Г	1:6400	
Н	1:12800	

Каждое из полученных разведений исследуют, как описано в разделе качественное исследование.

Титром IgG к вирусу КЭ считается максимальное разведение, при котором получен положительный результат.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Замораживание не допускается.

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Транспортирование

Замораживание не допускается. Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ИФА-КЭ-IgG», 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.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе

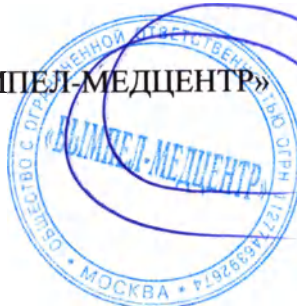


С.Г.Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

«12» 12 2016 г.



П.К. Варнавичус

КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА (ИФА-КЭ-IgG)

<u>Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!</u>	
Внести	в четные ряды планшета по 100 мкл рабочего разведения АГ _{КЭ} ; в нечетные-по 100 мкл рабочего разведения АГ _Н
Инкубация	60 мин, 37 °С
Промыть	3 раза ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 90 мкл РБР
Внести	в лунки А1, А2 – по 10 мкл К ⁺ , в лунки В1, В2 – по 10 мкл К ⁻ , в остальные лунки – по 10 мкл предварительно разведенных 1:10 образцов (см. п. <i>Подготовка исследуемых образцов</i>) в 2 лунки (1 лунка – в четном ряду, 1 лунка – в нечетном)
Инкубация	60 мин, 37 °С
Промыть	3 раза ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 100 мкл рабочего разведения конъюгата
Инкубация	30 мин, 37 °С
Промыть	6 раз ФСБ-Т
Внести	по 100 мкл индикаторного раствора в каждую лунку
Инкубация	10-15 мин, 18-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм)

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ

«12» _____ 2016 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

лист 06

Начальник ОНД ЗАО «ЭКОлаб»
Гашенко Т.Ю.

«12» _____ 2016 г.

