

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса М к вирусу
клещевого энцефалита

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ВектоВКЭ-IgM

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-1152

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВектоВКЭ-IgM» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М (IgM) к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ) в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях для диагностики клещевого энцефалита.

1.3. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли, или 12 независимых постановок по 8 определений, включая контроли.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Специфическими компонентами набора являются моноклональные антитела к IgM человека, иммобилизованные в лунках планшета, конъюгат моноклональных антител к антигену ВКЭ с пероксидазой хрена, антиген вируса клещевого энцефалита, а также положительный и отрицательный контрольные образцы.

Во время первой инкубации происходит связывание присутствующих в исследуемом образце иммуноглобулинов класса М с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к IgM человека.

После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки в лунки планшета вносят смесь конъюгата и антигена ВКЭ.

Во время второй инкубации связавшиеся с твердой фазой специфические IgM взаимодействуют с антигеном ВКЭ, находящемся в комплексе с пероксидазным конъюгатом.

После удаления несвязавшихся компонентов реакции, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. После добавления стоп-реагента спектрофотометрически измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–650 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgM к ВКЭ в анализируемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к IgM человека – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+ ; прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^- ; бледно-желтая с легкой опалесценцией жидкость) – 1 фл., 2,5 мл;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС; жидкость малинового цвета) – 1 фл., 10 мл;

- раствор для разведения сывороток (РРС; прозрачная или с легкой опалесценцией бесцветная жидкость) – 1 фл., 12 мл;
- антиген ВКЭ, концентрат (прозрачная бесцветная жидкость)– 1 фл., 1,5 мл;
- конъюгат, концентрат (моноклональные антитела к ВКЭ, меченные пероксидазой хрена; прозрачная синего цвета жидкость) – 1 фл., 1,5 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РРК; прозрачная или с легкой опалесценцией бесцветная жидкость) – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25, прозрачная бесцветная жидкость, допускается выпадение осадка солей) – 2 фл. по 28 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР; прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ; бесцветная или слегка желтоватая прозрачная жидкость)– 1 фл., 1 мл;
- стоп-реагент (прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток – 16 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы.

4.6. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , дioxлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

4.8. Точность и воспроизводимость результатов анализа зависят от строгого выполнения следующих правил:

– не используйте реагенты с истекшим сроком годности;

– при постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест»;

– *запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей;*

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

– не допускайте высыхания стрипов в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов;

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором субстрата;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду (предпочтительно одноразовую) и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

– необходимо следить за состоянием промывочного устройства – регулярно обрабатывать шланги и емкости 70% этиловым спиртом;

– рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

– никогда не используйте одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и рабочего раствора ТМБ; **обращаем Ваше особое внимание** на то, что малейшее, даже не видимое глазом загрязнение пипеток раствором конъюгата может привести к контаминации всего

содержимого флаконов с СБР и ТМБ, поэтому необходимо протирать рабочую поверхность стола и конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом перед внесением ТМБ в СБР;

- проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы;
- не изменяйте протокол исследования;
- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–650 нм; или при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37\pm 1)^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл;

- промыватель автоматический для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100, 1000 мл;
- флаконы стеклянные, вместимостью 10–15 мл;
- вода дистиллированная.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

6.4. Для отбора исследуемых образцов и компонентов набора реагентов использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, при температуре от 18 до 25°C не менее 60 мин.

7.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

7.2.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

7.2.2. После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение всего срока годности набора.

7.3. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.4. ПОДГОТОВКА КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

7.5. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМЫХ СЫВОРОТОК

Исследуемые сыворотки развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток, используя планшеты для предварительного разведения образцов, входящий в состав набора. Для этого к 90 мкл РПРС добавить 10 мкл цельной сыворотки, тщательно перемешать. При этом цвет раствора должен измениться с малинового на желтый. Если изменения цвета не произошло, сыворотка для анализа не годится (при разведении плазмы изменение цвета происходит незначительно).

Хранение: до 3 часов при 18–25°C.

7.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ДЛЯ ОТМЫВКИ ПЛАНШЕТА

Рабочий раствор для отмывки планшета приготовить разведением исходного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином в 25 раз.

Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

Хранение: не более 5 суток при 2–8°C.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество одновременно используемых стрипов	Рабочий раствор смеси концентрата антигена и конъюгата				Рабочий раствор ТМБ		Рабочий раствор для отмывки планшета	
	РРК, мл	Конъюгат, концентрат, мл	Антиген ВКЗ, концентрат, мл	ТМБ, концентрат, мл	СБР, мл	ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл	
1	1,0	0,1	0,1	0,05	1,0	2,0	до 50	
2	2,0	0,2	0,2	0,10	2,0	4,0	до 100	
3	3,0	0,3	0,3	0,15	3,0	6,0	до 150	
4	4,0	0,4	0,4	0,20	4,0	8,0	до 200	
5	5,0	0,5	0,5	0,25	5,0	10,0	до 250	
6	6,0	0,6	0,6	0,30	6,0	12,0	до 300	
7	7,0	0,7	0,7	0,35	7,0	14,0	до 350	
8	8,0	0,8	0,8	0,40	8,0	16,0	до 400	
9	9,0	0,9	0,9	0,45	9,0	18,0	до 450	
10	10,0	1,0	1,0	0,50	10,0	20,0	до 500	
11	11,0	1,1	1,1	0,55	11,0	22,0	до 550	
12	12,0	1,2	1,2	0,60	12,0	24,0	до 600	

7.7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЬЮГАТА И АНТИГЕНА ВКЭ

В зависимости от числа используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата (РРК), добавить соответствующее количество концентрата конъюгата и концентрата антигена ВКЭ, тщательно перемешать.

Хранение: до 3 часов при 18–25°C.

7.8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА

Внимание! Рекомендуется выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином. Посуду и наконечники для пипетки, контактирующие с раствором ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество СБР, добавить соответствующее

количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

Допустимо голубое окрашивание рабочего раствора ТМБ, которое не оказывает влияния на результаты анализа.

Хранение: не более 3 часов при 18–25°C в темноте.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Внимание! *Внесение контрольных и исследуемых образцов проводить достаточно быстро, в течение 15–20 мин, так как при более длительном внесении образцов в лунки планшета время инкубации первого и последнего образцов значительно отличаются, что может привести к неправильной оценке результатов.*

8.1. Внести контрольные образцы:

- **1 лунка** – 100 мкл K^+ ;
- **2 лунки** – по 100 мкл K^- .

Например, в лунки А-1 и В-1 внести по 100 мкл K^- , в лунку С-1 – 100 мкл K^+ .

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно подготовленных исследуемых сывороток (п. 7.5.). Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 100 раз.

Отрезать липкую пленку требуемого размера. Стрип закрыть пленкой и инкубировать в термостате 60 мин при 37°C.

8.2. По окончания инкубации осторожно снять пленку, поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть планшет 5 раз рабочим раствором для отмывки планшета (п. 7.6.) с помощью промывочного устройства. При этом в каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. В каждую лунку стрипа внести по 100 мкл рабочего раствора смеси конъюгата и антигена ВКЭ (п. 7.7.).

Для внесения рабочего раствора смеси конъюгата и антигена использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Отрезать лишнюю пленку требуемого размера. Стрип закрыть пленкой и инкубировать в термостате 60 мин при 37°C.

8.4. По окончании инкубации лунки стрипов промыть 5 раз рабочим раствором для отмывки планшета, как описано в п. 8.2.

8.5. Внести в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (п. 7.8.) и инкубировать

в темноте в течение 25 мин при температуре 18–25°.

Для внесения рабочего раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.6. Реакцию остановить добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента.

В случае попадания на кожу раствора ТМБ или стоп-реагента необходимо немедленно смыть их водой с мылом.

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референсфильтр в диапазоне 620–650 нм. Допускается измерение оптической плотности на одной длине волны – 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

- Внести:** 100 мкл K^+ , K^- ;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл исследуемых образцов, предварительно разведенных РПРС.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C.
- Промыть:** рабочим раствором для отмывки планшета, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора смеси конъюгата и антигена ВКЭ.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C.
- Промыть:** рабочим раствором для отмывки планшета, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реактента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–650 нм.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

11.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср} K^-$).

11.2. Результаты анализа учитывать при соблюдении следующих условий:

– значение $ОП_{ср} K^-$ должно быть не более 0,25 о.е.;

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,8 о.е.

11.3. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} K^- + 0,2$$

Результат анализа считать **положительным**, если $ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$,

где $ОП_{обр}$ – оптическая плотность в лунке с исследуемым образцом.

Результат анализа считать **отрицательным**, если $ОП_{обр} < ОП_{крит}$.

11.4. Для интерпретации результатов исследования мы рекомендуем использовать коэффициент позитивности (КП):

$$КП = \frac{ОП_{обр}}{ОП_{крит}}$$

Если $KП < 1$, результат анализа считают **отрицательным**.

Если $KП \geq 1$, результат анализа считают **положительным**.

Коэффициент позитивности – удобная и простая величина для наблюдения за динамикой развития иммунного ответа.

11.5. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации IgM к ВКЭ в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

12.1. Набор хранить и транспортировать при 2–8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток. Не допускать замораживания.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

12.2. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности.

12.3. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

**По вопросам, касающимся качества набора,
следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:**

630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46,
тел./факс (383) 332-67-49,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

16.12.09.

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: www.vector-best.ru