

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
антигена вируса клещевого энцефалита

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ВекторВКЭ-антиген

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-1154



1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВектоВКЭ-антиген» (далее по тексту – набор) предназначен для иммуноферментного выявления антигена вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в клещах и ликворе человека и животных.

1.2. Набор содержит все необходимые для проведения ИФА реагенты, кроме дистиллированной воды

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 93 неизвестных образцов, 3 контрольных образцов, всего 96 определений при использовании всего планшета. При отдельном использовании каждый стрип рассчитан на проведение анализа 5 неизвестных образцов, 3 контрольных образцов, всего 8 определений.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения антигена ВКЭ основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

Во время первой инкубации происходит связывание антигена ВКЭ, содержащегося в исследуемых образцах (клещах), с иммобилизованными на поверхности лунок планшета моноклональными антителами к ВКЭ. Образовавшийся комплекс выявляется с помощью конъюгата моноклональных антител к ВКЭ с пероксидазой хрена, который добавляется одновременно с исследуемыми образцами. Во время второй инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит

окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы «антиген-антитело». После добавления стоп-реагента спектрофотометрически измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–655 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена ВКЭ в анализируемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными моноклональными антителами к ВКЭ – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+ ; прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 2,0 мл;
- отрицательный контрольный образец (K^- ; прозрачная или с легкой опалесценцией бесцветная жидкость) – 1 фл., 3,0 мл;
- конъюгат, концентрат (моноклональные антитела к ВКЭ, меченные пероксидазой хрена; прозрачная жидкость синего цвета) – 1 фл., 0,7 мл;
- раствор для разведения исследуемых образцов (РРО; прозрачная или с легкой опалесценцией бесцветная жидкость) – 3 фл. по 12 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) – 1 фл., 28 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР; прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 13 мл;
 - тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ; прозрачная бесцветная жидкость)– 1 фл., 1 мл;
 - стоп-реагент (прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 12 мл;
 - пленка для заклеивания планшета – 1 шт.;
 - пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
 - наконечники для пипеток – 16 шт.;
 - инструкция – 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. 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 исследуемые образцы следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные передавать возбудителей вирусных и бактериальных 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 , деохлор, 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;

– используйте стеклянную посуду, тщательно вымытую и ополоснутую дистиллированной водой, или (предпочтительно) одноразовую посуду;

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

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

– 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 конъюгата и раствора ТМБ;

- перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протирать конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона с раствором ТМБ;
- 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.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

1. Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.

2. Используйте указанный в инструкции режим промывки.

3. Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

4. Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки.

5. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

6. Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

7. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм;
- термостат, поддерживающий температуру 24–26°C или термошейкер, поддерживающий температуру 24–26°C и интенсивность перемешивания 400–800 об/мин;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 50 до 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей от 50 мкл до 350 мкл;
- промыватель автоматический или ручной 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. Клеща обмыть 70%-ном раствором этилового спирта, высушить при помощи фильтровальной бумаги. Поместить в пробирку типа «Эшпендорф» и плотно закрыть.

Возможно хранение клещей в течение 3-х месяцев при температуре не выше минус 20°С.

6.2. Пробирку с клещом поместить в емкость с жидким азотом и заморозить в течение 20 мин.

6.3. Замороженного клеща тщательно растереть в этой же пробирке при помощи пестика для гомогенизации клещей (каталожный № Е-9259).

Для каждого образца клеща следует использовать отдельный пестик во избежание контаминации. Для повторного использования пестик необходимо инактивировать; выдержать в 70%-ном растворе этилового спирта в течение 30 мин, затем промыть дистиллированной водой и высушить.

6.4. В пробирку с растертым клещом добавить 220 мкл раствора для разведения образцов (РРО). Для напитавшихся клещей, а также клещей больших размеров, РРО вносить в количе-

стве, пропорциональном их объему, но не менее 400 мкл. Взвесь тщательно перемешать пипетированием до получения однородной суспензии.

6.5. Центрифугировать в течение 5 мин при 3000 об/мин. Для анализа использовать супернатант.

Возможно хранение подготовленных для анализа образцов клеток в течение 3 ч при температуре 2–8°C или в течение 3-х месяцев при температуре не выше минус 20°C.

6.6. Ликвор использовать для анализа без дополнительной подготовки.

Возможно хранение проб ликвора в течение 24 ч при температуре 2–8°C либо при температуре минус 20°C в течение 3 мес.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ И РЕАГЕНТОВ

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты не менее 60 мин при температуре 18–25°C.

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 отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение срока годности набора.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество одновременно используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор ТМБ		Промывочный раствор	
	Конъюгат, мкл	РРК, мл	ТМБ, мкл	СБР, мл	ФСБ-Т×25, мкл	Вода дистиллированная, мл
1	50	0,5	0,05	1,0	2,0	до 50
2	100	1,0	0,10	2,0	4,0	до 100
3	150	1,5	0,15	3,0	6,0	до 150
4	200	2,0	0,20	4,0	8,0	до 200
5	250	2,5	0,25	5,0	10,0	до 250
6	300	3,0	0,30	6,0	12,0	до 300
7	350	3,5	0,35	7,0	14,0	до 350
8	400	4,0	0,40	8,0	16,0	до 400
9	450	4,5	0,45	9,0	18,0	до 450
10	500	5,0	0,50	10,0	20,0	до 500
11	550	5,5	0,55	11,0	22,0	до 550
12	600	6,0	0,60	12,0	24,0	до 600

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°С в течение срока годности набора.

7.4. ПОДГОТОВКА КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

7.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз.

Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) 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.

7.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА

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, тщательно перемешать.

Хранение: до 3 часов при 18–25°C.

7.7. 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° С 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 план-*

шета 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 внести 100 мкл K^+ .

В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых образцов.

Во все лунки внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.6.).

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

Отрезать пленку требуемого размера. Стрип закрыть, плотно прижав пленку. Инкубировать 3 часа при температуре 24–26°C на термощейкере с интенсивностью перемешивания 400 об/мин или 18–20 часов при температуре 24–26°C в термостате (во влажной камере).

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.5.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок долж-

но быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. Внести в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (п. 7.7.) и инкубировать в темноте в течение 25 мин при температуре 18–25°C.

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

8.4. Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента.

В случае попадания на кожу раствора ТМБ необходимо немедленно смыть его 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!*

10.1. ТЕРМОСТАТ

- Внести:** по 100 мкл контрольных и исследуемых образцов.
- Внести:** по 50 мкл рабочего раствора конъюгата.
- Инкубировать:** 18–20 часов, 24–26°C.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора ТМБ.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

10.2. ТЕРМОШЕЙКЕР

- Внести:** по 100 мкл контрольных и исследуемых образцов.
- Внести:** по 50 мкл рабочего раствора конъюгата.
- Инкубировать:** 3 часа, 24–26°C, 400 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора ТМБ.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

Результаты анализа учитывать при соблюдении следующих условий:

- значение $ОП_{ср} K^-$ должно быть не более 0,2;
- значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно не менее чем в 5 раз превышать $ОП_{ср} K^-$.

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

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} K^- + 0,2$$

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

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

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

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

12.1. Набор реагентов «ВектоВКЭ - антиген» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности (12 мес.). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 суток.

Замораживание компонентов набора не допускается.

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

За справками и консультацией обращаться:
в лабораторию маркеров вирусных инфекций,
тел. (383) 227-75-40.

15.04.10.

**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