

ВЕКТОР

БЕСТ

Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
антигена аденовируса человека

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Аденовирус – антиген – ИФА – БЕСТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-1654

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Аденовирус – антиген – ИФА – БЕСТ» предназначен для выявления антигена аденовируса человека методом твердофазного иммуноферментного анализа в фекалиях больных острыми гастроэнтеритами и контактных лиц.

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

1.3. Значительная роль в развитии острых диарей принадлежит аденовирусам 40 и 41 серотипов. Они были идентифицированы в 1975 году с помощью электронной микроскопии в образцах фекалий младенцев и детей, страдающих острой кишечной инфекцией (ОКИ). Из-за тропизма к желудочно-кишечному тракту эти два серотипа названы «кишечными» аденовирусами. Доля аденовирусной инфекции в структуре ОКИ составляет от 2 до 38%.

Основной клинической формой ОКИ аденовирусной этиологии является острый гастроэнтерит. Рвота, лихорадка и жидкий стул – наиболее частые клинические проявления аденовирусного гастроэнтерита. При поражении кишечными аденовирусами брыжеечных лимфатических узлов возникает мезаденит, который по своей клинической картине напоминает острую абдоминальную патологию – перитонит или острый аппендицит.

Значительное увеличение брыжеечных лимфоузлов может привести к кишечной непроходимости.

Источником инфекции являются больные с острой или латентной аденовирусной инфекцией, чаще поражаются дети в возрасте от 1 года до 7 лет. Инфекция передается воздушно-капельным и фекально-оральным способом. Регистрируется во все сезоны года с пиком выявления как моно-, так и в составе микст-инфекций в осенний период. Аденовирус выделяется из организма больного с фекалиями во внешнюю среду до 1,5 месяцев.

После перенесенной инфекции формируется типоспецифический гуморальный иммунитет, связанный с синтезом сывороточных иммуноглобулинов класса М, А и G и секреторных IgA. Иммунитет не длительный, сохраняется в течение 8–12 месяцев после заболевания.

Лабораторная диагностика инфекции основана на определении вируса, его антигенов, вирусоспецифической ДНК в копроматериале больных с помощью электронной микроскопии, иммуноферментного анализа, цепной полимеразной реакции.

Отсутствие специфической профилактики, легкость инфицирования создают предпосылки для роста заболеваемости аденовирусной инфекцией. Своевременная этиологическая диагностика инфекции способствует быстрому купированию заболевания, выбору адекватной терапии, эффективному проведению профилактических мероприятий.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Специфическими компонентами набора являются моноклональные антитела к антигенам аденовируса человека, иммобилизованные в лунках планшета; конъюгат моноклональных антител к аденовирусу с пероксидазой хрена и контрольный положительный образец.

Принцип метода заключается во взаимодействии антигена аденовируса с моноклональными антителами, иммобилизованными в лунках полистиролового планшета. Комплекс «антиген-антитело» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата. После добавления раствора хромогена происходит окрашивание раствора в лунках. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена аденовируса в анализируемых образцах. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-волне в диапазоне 620–655 нм.

3. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к аденовирусу человека – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+ ; прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец (K^- ; прозрачная жидкость желтого цвета) – 1 фл., 3,0 мл;

- конъюгат моноклональных антител к аденовирусу, меченных пероксидазой хрена, концентрат (прозрачная жидкость синего цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РРК; бесцветная или светло-желтая жидкость, с легкой опалесценцией) – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25; прозрачная бесцветная жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре от 30 до 40°C) – 1 фл., 28 мл;
- раствор для образцов, концентрат (РО; прозрачная бесцветная жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре от 30 до 40°C) – 1 фл., 20 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР; прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 1,0 мл;
- стоп-реагент (прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки – 16 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Все компоненты набора являются не-токсичными.

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, как при работе с потенциально инфекционными материалами.

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

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 ка-

чество 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.

5. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

При постановке реакции следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.

Для приготовления реагентов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Раствор ТМБ и раствор конъюгата в рабочем разведении желательно готовить непосредственно перед использованием. Следует исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

При автоматическом промывании планшета необходимо следить за состоянием емкости с промывочным раствором и соединительных шлангов, не допуская образования в них микробных проростов. Для этого раз в неделю емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% этиловым спиртом.

Нельзя допускать высыхания лунок между отдельными операциями.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 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 5000 мкл;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл;
- промыватель автоматический или ручной для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100мл, 1000 мл;
- колбы мерные вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты набора, в том числе и запечатан-

ный 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 отбора части содержимого 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

Непосредственно перед использованием вскрыть пакет с планшетом выше застёжки, отступив примерно 1 см. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов; остальные стрипы снять с рамки и обратно поместить в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы после первого вскрытия пакета можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение срока годности набора.

7.4. ПОДГОТОВКА КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

Положительный и отрицательный контрольные образцы (K^+ и K^-) готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

7.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА

Промывочный раствор 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) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате ФСБ-Т необходимо прогреть его при температуре 30–40°C до полного растворения осадка.

Хранение: не более 5 суток при 2–8°C.

7.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ДЛЯ ОБРАЗЦОВ

Содержимое флакона с концентратом раствора для образцов добавить к 480 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать.

В случае дробного использования концентрат раствора для образцов следует разводить дистиллированной водой в соотношении 1 часть концентрата на 24 части дистиллированной воды.

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

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор ТМБ		Промывочный раствор	
	Концентрат конъюгата, мл	РРК, мл	ТМБ, концентрат, мл	СБР мл	ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистил. вода, мл
1	0,1	1,0	0,05	1,0	2,0	до 50
2	0,2	2,0	0,10	2,0	4,0	до 100
3	0,3	3,0	0,15	3,0	6,0	до 150
4	0,4	4,0	0,20	4,0	8,0	до 200
5	0,5	5,0	0,25	5,0	10,0	до 250
6	0,6	6,0	0,30	6,0	12,0	до 300
7	0,7	7,0	0,35	7,0	14,0	до 350
8	0,8	8,0	0,40	8,0	16,0	до 400
9	0,9	9,0	0,45	9,0	18,0	до 450
10	1,0	10,0	0,50	10,0	20,0	до 500
11	1,1	11,0	0,55	11,0	22,0	до 550
12	1,2	12,0	0,60	12,0	24,0	до 600

7.7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА

В соответствии с числом стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в чистый флакон внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата (РРК), добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Хранение: не более 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.*

7.9. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для выявления антигена (АГ) аденовируса в фекалиях предварительно готовят экстракт 20%-ной суспензии фекалий на рабочем растворе для

образцов (см. п. 7.6.) Образцы фекалий собирают в стерильные флаконы (контейнеры) с пробкой вместимостью 10 мл. Фекалии в количестве 1 г ($\frac{1}{4}$ флакона) встряхивают с 5,0 мл рабочего раствора для образцов до получения гомогенной взвеси, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин. С помощью пипетки осторожно отбирают надосадочную жидкость в чистую пробирку. Полученную надосадочную жидкость исследуют.

Для выявления АГ аденовируса используют как свежеприготовленный образец, так и хранившийся при 2–8°C в течение 24 часов, либо замороженный при минус 20°C в течение 3 месяцев.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести контрольные образцы:

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

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

Во все остальные лунки внести по 100 мкл подготовленных исследуемых образцов (п. 7.9.).

8.2. Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.7.).

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

8.3. Отрезать лишнюю пленку требуемого размера. Стрип закрыть, плотно прижав плен-

ку. Инкубировать в термостате 30 мин при температуре 37°C.

8.4. 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 должно 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.

Внимание! *Промывку при помощи автоматического промывателя рекомендуется проводить в режиме с переполнением («Overflow») с 5-ю циклами промывки и внесением в лунки по 600–700 мкл промывочного раствора.*

8.5. Внести во все лунки планшета по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (п. 7.8.). Планшет поместить в защищенное от света место и выдержать в течение 25 мин при температуре 18–25°C.

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

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

Внимание! В случае попадания на кожу раствора ТМБ или стоп-реагента необходимо немедленно смыть их большим количеством проточной воды.

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре в двух-волновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–655 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:** по 100 мкл K^+ , K^- ;
по 100 мкл анализируемых образцов.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл (600–700 мкл в режиме переполнения), 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина.

- 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. РАСЧЕТЫ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

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

11.2. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,20.

Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,70.

11.3. Оценку результатов проводить при условии полного выполнения положений п. 11.2.

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

$$ОП_{крит} = ОП_{ср.К^-} + 0,2$$

11.5. Результат анализа считают **положительным**, если $ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$, где $ОП_{обр}$ – оптическая плотность исследуемого образца.

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

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

12.1. Набор «Аденовирус – антиген – ИФА – БЕСТ» должен храниться 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 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

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

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

Запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

**По вопросам, касающимся качества набора реагентов,
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

10.03.10.

**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
ТОРСН-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