

«СОГЛАСОВАНО»

Директор

ФГБНУ НИИВС

им. И.И. Мечникова

 О.А. Свитич

« 12 » 05 2020 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник Управления

регистрации

и медицинских исследований

АО «НПО «Микроген»

 А.Е. Ершов

« 14 » 05 2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

Диагностикум клещевого энцефалита сухой для РТГА, РСК, РРГ
по ТУ 21.10.60-071-20401675-2019

Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03138

НАЗНАЧЕНИЕ

Изделие для диагностики *in vitro* предназначено для выявления антител к вирусу клещевого энцефалита (КЭ) в образцах сыворотки (плазмы) крови человека в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), реакции связывания комплемента (РСК) и реакции радиального гемолиза в геле (РРГ).

Функциональное назначение – вспомогательное средство в диагностике клещевого энцефалита.

Показания к применению изделия в соответствии с его назначением.

Противопоказания при применении изделия согласно инструкции – отсутствуют.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

Состав медицинского изделия:

1. Диагностикум КЭ инаktivированный – 10 амп. по 1 мл;
2. К⁺ РТГА – 2 амп. по 1 мл;
3. К⁻ РТГА – 2 амп. по 1 мл;
4. К⁺ РСК – 2 амп. по 0,5 мл;
5. К⁻ РСК – 2 амп. по 0,5 мл;
6. Смесь солей для приготовления ББР – 3 пакета по 1 табл.;
7. Смесь солей для приготовления ФБР – 2 пакета по 4 табл.;
8. Смесь солей для приготовления раствора Альсевера – 1 пакет, 5 табл.;
9. Каолин – 1 стакан, 60 г.

Комплектация: компоненты изделия в коробке из картона вместе с инструкцией по применению, паспорт (в комплекте поставки).

Характеристика компонентов изделия.

1. Диагностикум клещевого энцефалита (диагностикум КЭ) – антиген вируса КЭ, полученный из мозга нелинейных белых мышей, инфицированных вирусом КЭ, методом боратно-солевой экстракции, очищенный протамина сульфатом или фреоном (хладоном-113), инаktivированный бета-пропиолактоном, лиофилизированный – аморфный порошок кремового цвета, после растворения – прозрачная жидкость светло-желтого цвета, выпускаемый в комплекте с реагентами для постановки РТГА, РСК и РРГ. Титр специфических гемагглютининов не ниже чем 1:160, комплементсвязывающих антигенов – не ниже чем 1:32.

2. Положительный контрольный образец для РТГА (К⁺ РТГА) – асцитная жидкость крыс, иммунизированных вирусом КЭ в виде 10 % вируссодержащей суспензии мозга крысят-сосунков с последующим введением в брюшную полость крыс клеток опухоли яичника крысы для индукции асцита, обработанная хлороформом, каолином и гусиными эритроцитами,

лиофилизированная – пористая масса кремового или коричневого цвета, после растворения – прозрачная жидкость от светло-желтого до светло-коричневого цвета. Титр антигеммагглютинирующих антител – не ниже чем 1:160.

3. Отрицательный контрольный образец для РТГА (K^- РТГА) – асцитная жидкость не иммунизированных крыс, индуцированная путем введения клеток опухоли яичника крысы, обработанная хлороформом, каолином и гусиными эритроцитами, лиофилизированная – пористая масса кремового или коричневого цвета, после растворения – прозрачная жидкость от светло-желтого до светло-коричневого цвета.

4. Положительный контрольный образец для РСК (K^+ РСК) – асцитная жидкость крыс, иммунизированных вирусом КЭ (как описано для K^+ РТГА), обработанная хлороформом, лиофилизированная – пористая масса кремового или коричневого цвета, после растворения – прозрачная жидкость от желтого до коричневого цвета. Титр комплементсвязывающих антител не ниже чем 1:32.

5. Отрицательный контрольный образец для РСК (K^- РСК) – асцитная жидкость не иммунизированных крыс, обработанная хлороформом, лиофилизированная – пористая масса кремового или коричневого цвета, после растворения – прозрачная жидкость от желтого до коричневого цвета.

6. Смесь солей для приготовления боратного буферного раствора (ББР) $pH\ 9,00 \pm 0,05$ – таблетка белого цвета массой $1,05 \pm 0,02$ г, в состав которой входят: натрия хлорид, кислота борная, кальция стеарат (наполнитель). 1 пакет (1 таблетка) рассчитан для приготовления 100 мл раствора ББР.

7. Смесь солей для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) $pH\ 6,20 \pm 0,05$ – таблетки белого цвета общей массой $4,12 \pm 0,08$ г, в состав которых входят: натрия хлорид, динатрия гидрофосфат додекагидрат/натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, натрия дигидрофосфат дигидрат/натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный, кальция стеарат. 1 пакет (4 таблетки) рассчитан для приготовления 100 мл раствора ФБР.

8. Смесь солей для приготовления раствора Альсевра – таблетки белого цвета общей массой $5,30 \pm 0,10$ г, в состав которых входят: кислота лимонная моногидрат, натрия цитрат моногидрат/натрий лимоннокислый 5,5-водный, декстрозы моногидрат, кальция стеарат. 1 пакет (5 таблеток) рассчитан для получения 100 мл раствора.

9. Каолин (белая глина) – белый порошок с сероватым, желтоватым или зеленоватым оттенком, для обработки исследуемых образцов перед анализом.

ПРИНЦИП МЕТОДА И ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Специфическим компонентом набора является диагностикум КЭ, который способен выявлять антитела к вирусу клещевого энцефалита в сыворотках (плазме) крови человека в РТГА, РСК и РРГ.

Принцип РТГА: диагностикум КЭ (антиген вируса клещевого энцефалита) способен вызывать агглютинацию взвеси гусиных эритроцитов в зоне слабокислых значений pH. В присутствии сыворотки, содержащей антитела к вирусу клещевого энцефалита, агглютинация тормозится (подавляется), благодаря блокировке антителами к вирусу КЭ ответственного за этот феномен антигена – гемагглютиниона (ГА), обычно располагающегося на поверхности вириона.

Принцип РСК: комплекс антиген-антитело обладает способностью связывать комплемент. В реакции участвуют две системы антиген+антитело: специфическая (диагностикум КЭ + сыворотка/плазма крови человека) и индикаторная (эритроциты барана + гемолизин). После взаимодействия (на первом этапе реакции) вирусных антигенов КЭ с антителами из сыворотки/плазмы, с комплексом антиген-антитело связывается комплемент, и он уже не может быть использован для лизиса эритроцитов (которые в смеси с гемолизином добавляют на втором этапе реакции). Таким образом, отсутствие лизиса эритроцитов говорит о положительном результате реакции (наличии антител к вирусу КЭ в исследуемом образце).

Принцип РРГ: при взаимодействии с антителами сенсibilизированных вирусным антигеном эритроцитов барана в присутствии комплемента происходит реакция лизиса эритроцитов. Суспензию бараньих эритроцитов обрабатывают диагностикумом КЭ, отмывают и вносят в расплавленный агарозный гель, одновременно добавляя туда комплемент. После перемешивания гель тонким слоем наливают на стеклянную пластину и после затвердения вырезают в нем лунки диаметром 2 мм. В лунки наливают по 5 мкл исследуемой сыворотки/плазмы (предварительно прогретой для удаления содержащегося в них комплемента). Диффундируя через гель, антитела образуют комплекс с антигеном и комплементом на поверхности эритроцитов, следствием чего является лизис. Вокруг лунок образуется прозрачная зона гемолиза, диаметр которой пропорционален концентрации специфических антител к вирусу КЭ.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Изделие предназначено для лабораторной диагностики, для однократного применения по назначению. Изделие является нестерильным.

Вид анализа – полуколичественный. Целевой анализ – антитела к вирусу КЭ.

Изделие ремонту и обслуживанию не подлежит. Монтаж, наладка, калибровка и прочие операции, необходимые для ввода МИ в эксплуатацию и его правильной эксплуатации не требуются.

Набор реагентов рассчитан на исследование 200 образцов одновременно в трех тестах: РТГА, РСК, РРГ.

Пользователями изделия могут быть медицинские специалисты по лабораторной диагностике с высшим и средним специальным образованием, прошедшие специальную подготовку и допущенные к работе с патогенными микроорганизмами в соответствии с СП 1.3.2322-08 (без выделения возбудителя).

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

РТГА является высокочувствительным анализом. Для флавивирусов (к которым относится вирус КЭ) РТГА дает группоспецифический ответ (т.е. может выявлять антитела как к видоспецифичным, так и группоспецифичным антигенным детерминантам флавивирусов). В частности, могут наблюдаться перекрестные реакции с сыворотками, содержащими антитела против вирусов комплекса КЭ и комплекса японского энцефалита, но на уровне значительно ниже, чем с гомологичным антигеном.

РСК относится к числу малочувствительных методов (выявляет антитела, когда их много), при этом наряду с видоспецифичными могут обнаруживаться (в меньшей степени) и группоспецифичные антитела флавивирусов. При анализе в РСК могут наблюдаться также перекрестные реакции с сыворотками, содержащими антитела к антигенам мозговой ткани мышей. Обнаружение специфических комплементсвязывающих антител свидетельствует о недавно перенесенной инфекции.

РРГ обладает чувствительностью на уровне не ниже, чем в РТГА. В данной реакции IgG-антитела выявляются даже спустя годы после заболевания.

При анализе исследуемых образцов положительным результатом в РТГА следует считать титр не ниже 1:20, в РСК – не ниже 1:4, в РРГ – зону гемолиза не менее 4 мм.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ИЗДЕЛИЕМ

Класс потенциального риска применения набора – 2б.

Медицинское изделие является безопасным при транспортировании, хранении и применении и не приносит вреда окружающей природной среде и здоровью человека. Изделие специфически безопасно (не содержит материалов, которые могут инфицировать персонал во время анализа). Диагностикум КЭ и положительные контрольные образцы для РТГА и РСК комплектуются в набор только после подтверждения специфической безопасности.

Однако при работе с исследуемым материалом следует соблюдать правила техники безопасности в соответствии с ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», исследования без выделения возбудителя могут проводиться в лабораториях, имеющих разрешительные документы на работу с микроорганизмами III - IV групп патогенности в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп пато-

генности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» с дополнениями СП 1.3.2518-09 и СП 1.3.2885-11.

Необходимо:

- работать с применением индивидуальных средств защиты (защитной одежды, одноразовых резиновых перчаток, шапочки, защитного экрана или очков);
- использовать автоматические пипетки (дозаторы) с одноразовыми пластиковыми накопечниками;
- оборудование, находившееся в контакте с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать 70 % этиловым спиртом;
- все использованные материалы, сточные растворы, одноразовую лабораторную посуду перед утилизацией следует обеззараживать, как потенциально инфицированный материал, физическими или химическими методами по режимам в соответствии с СП 1.3.2322-08 (предпочтительный и унифицированный режим обеззараживания – автоклавирование при температуре $(132 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 0,2 МПа в течение 45 мин).

Утилизация изделий, пришедших в негодность, с истекшим сроком годности и изделий после контакта с биологическими образцами осуществляется в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

МЕРЫ ПО СНИЖЕНИЮ РИСКОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ИЗДЕЛИЯ.

При работе с изделием следует учитывать требования СП 3.1.3.2352-08 «Профилактика клещевого вирусного энцефалита. Санитарно-эпидемиологические правила», СП 3.1.3310-15 «Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами. Санитарно-эпидемиологические правила».

Требования к персоналу, который проводит исследования, изложено в СП 1.3.2322-08.

Объективные результаты анализа гарантируются при выполнении следующих условий:

- хранение всех реагентов набора осуществлять при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$;
- не использовать реагенты с истекшим сроком годности;
- перед использованием набор необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 $^\circ\text{C}$;
- не использовать реагенты набора при отсутствии на их упаковке соответствующей маркировки;
- для проведения анализа использовать реагенты, входящие в данный набор и предусмотренные настоящей инструкцией.
-

ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С ИЗДЕЛИЕМ:

- рН-метр;
- весы торсионные;
- часы;
- дозаторы переменного объема (механические или электронные): 8- или 12-канальные с объемом дозирования от 5 до 50 мкл и 1-канальные с объемом дозирования от 1 до 5 (10) мкл, от 10 (20) до 100 (200) мкл, от 100 до 1000 мкл и от 1 до 10 мл;
- наконечники, соответствующие дозаторам;
- пипетки стеклянные градуированные 2-го класса точности вместимостью 10; 5; 2; 1 мл (ГОСТ 1770);
- холодильник бытовой;
- водяная баня (аппарат для инактивации сывороток);
- термостат;
- центрифуга лабораторная (1000-2500 об/мин);
- штативы для пробирок;
- планшеты для иммунологических реакций;
- чашки Петри диаметром 100 мм;
- стаканы химические мерные или колбы мерные вместимостью 100 мл, 1000 мл (ГОСТ 1770 или ГОСТ 25336);
- пробирки стеклянные вместимостью 10 мл (ГОСТ 25336) или флаконы вместимостью 10-20 мл;
- груша резиновая;
- шприц вместимостью 10 или 20 мл;
- бумага фильтровальная (ГОСТ 12026);
- вода очищенная (ФС.2.2.0020.18) или вода дистиллированная (ГОСТ Р 58144), далее - вода;
- раствор натрия хлорида 0,9 % (рН 7,2-7,4) стерильный.

Другие реактивы и материалы, необходимые для постановки анализов, описаны ниже в разделе «ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА» и в соответствующих подразделах «Подготовка реагентов для проведения анализа».

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа пригодны сыворотки или плазмы крови человека, полученные стандартными лабораторными методами. Возможно использование плазмы с добавлением цитрата, гепарина или этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

Все образцы должны быть промаркированы (идентифицированы).

Для проведения анализа не следует использовать мутную, хилезную, гемолизированную сыворотку/плазму крови во избежание ошибочных результатов. Пробы сыворотки/плазмы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 2 недель или при температуре не выше минус 20 °С не более 1 года аликвотами (их повторное замораживание и размораживание не рекомендуется). Образцы, содержащие осадок, следует очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 10 мин.

Для РТГА исследуемые образцы перед анализом на антитела к вирусу КЭ обрабатывают каолином, чтобы удалить неспецифические ингибиторы гемагглютинации (ГА), а затем освобождают от нормальных гетероагглютининов, адсорбируя их эритроцитами гуся.

Для РСК исследуемые образцы сывороток (плазм) перед анализом прогревают для инактивации содержащегося в них комплемента. Образцы разводят Разбавителем (приготовление см. п. 2.1.1) 1:4 или 1:8 и прогревают при температуре 57-59 °С в течение 30 мин.

Для подтверждения клинического диагноза у больных с подозрением на клещевой энцефалит исследуют парные сыворотки, полученные на 5-7 и 14-21 дни заболевания.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Реакция торможения гемагглютинации.

Реакцию ставят микрометодом в общем объеме 0,1 мл. Для постановки реакции используют многоканальные пипетки с объемом дозирования 5-50 мкл и погрешностью измерения объемов не более 3 % и планшеты для иммунологических реакций по ТУ 64-2-278-79.

Реакцию ставят в два этапа. Первый этап опыта – постановка реакции гемагглютинации (РГА) для определения титра диагностикума КЭ и его рабочего разведения; второй этап – постановка РТГА для определения титра исследуемых и контрольных образцов.

1.1. Подготовка реагентов для проведения анализа.

1.1.1. Боратный буферный раствор pH 9,00±0,05 (ББР).

Содержимое пакета со смесью солей (1 таблетка) растворяют в 100 мл воды при температуре 18-25 °С в течение 18-20 ч с последующим перемешиванием. При необходимости, для ускорения растворения подогревают на водяной бане при температуре 80-90 °С, перемешивают, охлаждают до температуры 18-25 °С. Нерастворимый осадок (наполнитель) отделяют фильтрованием через бумажный фильтр, после чего pH раствора доводят до 9,00±0,05 добавлением 2-2,2 мл 4 % раствора натрия гидроксида* по ГОСТ 4328, pH определяют потенциометрически.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

*Примечание: 4 % раствор натрия гидроксида хранят при температуре 20-25 °С в пластиковом флаконе не более 14 сут, в стеклянном флаконе – не более 7 сут.

1.1.2. Фосфатный буферный раствор pH 6,20±0,05 (ФБР).

Содержимое пакета со смесью солей (4 таблетки) растворяют в 100 мл воды при температуре 18-25 °С в течение 18-20 ч с последующим перемешиванием. При необходимости для ускорения растворения подогревают на водяной бане при температуре 80-90 °С, перемешивают, охлаждают до температуры 18-25 °С. Нерастворимый осадок (наполнитель) отделяют фильтрованием через бумажный фильтр, рН определяют потенциометрически.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

1.1.3. Раствор Альсевера.

Содержимое пакета (5 таблеток) растворяют в 100 мл воды при температуре 18-25 °С в течение 18-20 ч с последующим перемешиванием. При необходимости для ускорения растворения подогревают на водяной бане при температуре 80-90 °С, перемешивают, охлаждают до температуры 18-25 °С. Нерастворимый осадок (наполнитель) отделяют фильтрованием через бумажный фильтр.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

Допускается вместо раствора Альсевера применять рабочий раствор гепарина с активностью 2,5-3 МЕ в 1 мл. Для приготовления рабочего раствора гепарин с активностью 5000 МЕ в 1 мл смешивают с раствором натрия хлорида 0,9 % в соотношении 1:2000 или 1:1500.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

1.1.4. Взвесь каолина 25 %.

30 г каолина соединяют со 120 мл ББР при постоянном помешивании. Используют не ранее, чем через 1 сут после приготовления, перед использованием тщательно взбалтывают.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С, срок хранения не ограничен.

1.1.5. Взвесь эритроцитов гусей в ФБР 0,4 %.

Кровь у гусей-доноров берут из подкрыльцевой вены шприцем. Для предотвращения свертывания и консервации кровь смешивают с равным объемом раствора Альсевера или рабочего раствора гепарина.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 8 сут.

Для получения эритроцитов непосредственно перед использованием необходимое количество крови центрифугируют при 1500-1800 об/мин в течение 8-10 мин. Осадок эритроцитов трижды отмывают, ресуспендируя в 10-15 кратном объеме раствора натрия хлорида 0,9 % и осаждают центрифугированием при 1500-1800 об/мин в течение 8-10 мин. Надосадочную жидкость сливают.

К 25 мл ФБР добавляют 0,1 мл эритроцитов из осадка. Взвесь эритроцитов хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

Неразведенные эритроциты (осадок) используют для подготовки исследуемых образцов (см. п. 1.1.9). Хранению не подлежат.

1.1.6. Диагностикум КЭ.

Содержимое ампулы с диагностикумом КЭ растворяют в 1 мл воды, через 1-2 мин добавляют 9 мл ББР, выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 1-1,5 ч для стабилизации (разведение 1:10).

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

1.1.7. Положительный контрольный образец для РТГА (К⁺ РТГА).

В ампулу с К⁺ РТГА вносят 1 мл воды, выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 1-1,5 ч для стабилизации.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

1.1.8. Отрицательный контрольный образец для РТГА (К⁻ РТГА).

В ампулу с К⁻ РТГА вносят 1 мл воды, выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 1-1,5 ч для стабилизации.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

1.1.9. Исследуемые образцы.

Исследуемые образцы (сыворотки, плазмы) обрабатывают каолином и гусиными эритроцитами для удаления неспецифических гемагглютининов и ингибиторов гемагглютинации. К 0,1 мл исследуемого образца добавляют 0,4 мл ББР и 0,5 мл 25 % взвеси каолина, смесь встряхивают в течение 20-25 мин при температуре 20-25 °С вручную или на аппарате для встряхивания, центрифугируют при 2000-2500 об/мин в течение 30-35 мин.

К надосадочной жидкости добавляют 0,025 мл неразведенных эритроцитов (из осадка, получение описано в п. 1.1.5). Пробирку со смесью помещают на лед для предотвращения гемолиза, встряхивают в течение 20-30 мин, затем центрифугируют при 1800-2000 об/мин в течение 15-20 мин. В результате обработки получают 0,6-0,8 мл исследуемого образца в разведении 1:10.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут, при температуре не выше минус 20 °С не более 1 года.

1.2. Проведение реакции гемагглютинации (РГА).

1.2.1. Определение титра и рабочего разведения диагностикума КЭ.

В 3 ряда лунок планшета для иммунологических реакций вносят по 0,05 мл ББР. В первую лунку каждого ряда вносят по 0,05 мл диагностикума КЭ. Перемешивают 8-10 раз при помощи многоканальной пипетки и последовательно переносят во все лунки рядов по 0,05 мл, из последней лунки убирают 0,05 мл. Получают последовательные разведения диагностикума КЭ с коэффициентом 2. Ставят контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию: по 0,05 мл ББР вносят в 2-3 лунки. Во все лунки добавляют по 0,05 мл 0,4 % взвеси эритроцитов. Планшет встряхивают в горизонтальной плоскости, выдерживают при температуре от 18 до 25 °С в течение

ние 30-40 мин.

Учет реакции проводят при отсутствии агглютинации в лунках контроля эритроцитов. Результаты учитывают визуально по 4-крестовой системе:

- плюс 4 (+4) — полная гемагглютинация (однородная пленка эритроцитов, покрывающая дно лунки);
- плюс 3 (+3) — гемагглютинация меньшей степени интенсивности (однородная пленка эритроцитов со следами плотного осадка эритроцитов);
- плюс 2 (+2) — частичная гемагглютинация (однородная пленка эритроцитов на дне лунки в сочетании с более плотным осадком эритроцитов);
- плюс 1 (+1) — следы гемагглютинации (следы однородной пленки эритроцитов на дне лунки в сочетании с плотным осадком эритроцитов);
- минус (–) — отсутствие гемагглютинации (осевшие эритроциты имеют вид компактного осадка).

Положительным результатом в РГА считают агглютинацию эритроцитов на +3 и +4. За титр диагностикума КЭ принимают его максимальное разведение, давшее гемагглютинацию не менее чем на +3.

В РТГА диагностикум КЭ используют в рабочем разведении, содержащем 8 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ). Например, при титре диагностикума 1:320 – в разведении 1:40: к 2 мл диагностикума КЭ в разведении 1:10 добавляют 6 мл ББР.

Перед постановкой РТГА приготовленное рабочее разведение диагностикума КЭ контролируют в РГА.

1.2.2. Контроль рабочего разведения диагностикума КЭ.

В 3 ряда лунок вносят по 0,05 мл ББР, затем вносят в первую лунку каждого ряда по 0,05 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении (например, 1:40). Раститровывают так, как описано при постановке РГА. Ставят контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию: в 2-3 лунки вносят по 0,05 мл ББР. Во все лунки добавляют по 0,05 мл 0,4 % взвеси эритроцитов.

Планшет встряхивают в горизонтальной плоскости и выдерживают при температуре от 18 до 25 °С в течение 30-40 мин. Результаты учитывают при отсутствии агглютинации в лунках контроля эритроцитов.

Рабочее разведение используют для постановки РТГА, если по результатам контроля в нем содержится 8 ГАЕ (наблюдается гемагглютинация в трех его последовательных двукратных разведениях не менее чем на +3). Если рабочее разведение диагностикума КЭ по результатам контроля не содержит 8 ГАЕ, то его необходимо приготовить заново, изменив соотношение диагностикума КЭ и разбавителя в зависимости от результата контроля. Контроль рабочего разведения повторяют.

1.3. Проведение анализа РТГА.

В РТГА титруют исследуемые образцы (у больных одновременно титруют парные сыворотки (плазмы)), а также K^+ РТГА и K^- РТГА.

В 4 ряда лунок планшета для иммунологических реакций, начиная со второй в каждом ряду (внесение ингредиентов в лунки планшета см. Таблицу 1), вносят по 0,025 мл ББР, затем в первые и вторые лунки вносят по 0,025 мл исследуемых и контрольных образцов, соответственно маркировке рядов. Перемешивают 8-10 раз при помощи пипетки и последовательно переносят, начиная со второй, во все лунки рядов. Получают разведения исследуемых и контрольных образцов с коэффициентом 2. В каждую лунку добавляют по 0,025 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении (в нашем примере – 1:40).

Одновременно ставят контроли:

- контроль исследуемых и контрольных образцов на полноту удаления неспецифических гемагглютининов – в лунку вносят по 0,025 мл пробы и ББР;

- контроль исследуемых и контрольных образцов на полноту удаления ингибиторов гемагглютинации – 4-5 капель пробы кипятят 1-3 мин, после чего вносят 0,025 мл в лунку и добавляют 0,025 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении;

- контроль рабочего разведения диагностикума КЭ проводят дважды: в день постановки опыта и в день учета результатов (см. п.1.2.2);

- контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию – в 2-3 лунки вносят по 0,05 мл ББР.

Таблица 1

*Внесение ингредиентов в лунки планшета для иммунологических реакций
при проведении анализа РТГА*

Наименование ингредиентов	Номера рядов	Разведение исследуемых и контрольных образцов (в обратных величинах)							Контроль			Контроль рабочего разведения диагностикума			
		10	20	40	80	160	320	640	Исследуем. и контрольных образцов на полную реакцию неспецифического геммагглютинации	Исследуем. и контрольных образцов на полную реакцию ингибиторов геммагглютинации	Эритроциты на спонтанную агглютинацию	Разведение диагностикума (в обратных величинах)			
ББР	1-4		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025						
K ⁺ РТГА	1	0,025	0,025	переносят по 0,025					0,025	0,025*					
Исследуемый образец I	2	0,025	0,025	переносят по 0,025					0,025	0,025*					
Исследуемый образец II	3	0,025	0,025	переносят по 0,025					0,025	0,025*					
K ⁻ РТГА	4	0,025	0,025	переносят по 0,025					0,025	0,025*					
Диагностикум КЭ в рабочем разведении (1:40)	1-4	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025		0,025					
Эритроциты	1-4	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05					
ББР	5-7										0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Диагностикум КЭ в рабочем разведении (1:40)	5-7											0,05	переносят по 0,05		
Эритроциты	5-7										0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

Примечания: указано количество ингредиентов в мл;

* – исследуемый и контрольный образцы, прогретые при температуре 100 °С.

После соединения ингредиентов (компонентов смеси) планшет встряхивают в горизонтальной плоскости, выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 18-20 ч. Затем во все лунки добавляют по 0,05 мл 0,4 % взвеси эритроцитов, планшет встряхивают в горизонтальной плоскости и выдерживают при температуре от 18 до 25 °С в течение 30-40 мин, после чего учитывают результаты.

2. Реакция связывания комплемента.

Реакцию ставят микрометодом в общем объеме 0,125 мл. Для постановки реакции используют многоканальные пипетки с объемом дозирования 5-50 мкл, погрешностью измерения объемов не более 5 % и планшеты для иммунологических реакций.

Реакцию ставят в два этапа. Первый этап – определение титра комплемента в присутствии диагностикума КЭ и выбор его рабочего разведения, содержащего 2 единицы комплемента. Второй этап – определение титра исследуемых и контрольных образцов методом линейного титрования с использованием 4 комплементсвязывающих единиц (КСЕ) диагностикума КЭ.

2.1. Подготовка реагентов для анализа.

2.1.1. Разбавитель.

В 1 л раствора натрия хлорида 0,9 % растворяют 0,1 г магния хлорида шестиводного по ГОСТ 4209 и 0,04 г кальция хлорида двуводного по ТУ 6-09-5077-83, фильтруют через бумажный фильтр.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

2.1.2. Диагностикум КЭ.

В ампулу с диагностикумом КЭ вносят 1 мл воды, через 1-2 мин готовят рабочее разведение, содержащее 4 КСЕ диагностикума КЭ, исходя из титра, указанного на ампуле (этикетке). Например, 1:8 (при титре в РСК 1:32): к 1 мл диагностикума КЭ добавляют 7 мл Разбавителя, выдерживают 1-1,5 ч при температуре от 2 до 8 °С для стабилизации.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

2.1.3. K^+ РСК. В ампулу с K^+ РСК вносят 0,5 мл воды, затем готовят разведение, соответствующее 4-кратному титру, указанному на ампуле (этикетке) контрольного образца, например, 1:16 (при титре 1:64): к 0,5 мл K^+ РСК добавляют 7,5 мл Разбавителя. Прогревают на аппарате для инактивации сывороток (водяной бане) при температуре 59-61 °С в течение 30 мин.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

2.1.4. K^- РСК. В ампулу с K^- РСК вносят 0,5 мл воды, затем добавляют 3,5 мл Разбавителя (разведение 1:8). Прогревают на аппарате для инактивации сывороток (водяной бане) при температуре 59-61 °С в течение 30 мин.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

2.1.5. Исследуемые образцы. Подготовка образцов для анализа в РСК описана в разделе «АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ».

2.1.6. Комплемент.

В ампулу с «Комплементом сухим» (АО НПО «Микроген») вносят раствор натрия хлорида 0,9 % в объеме, указанном на ампуле (этикетке). Выдерживают для стабилизации при температуре от 2 до 8 °С в течение 1-1,5 ч. Используют в течение 1 сут.

2.1.7. Сыворотка гемолитическая.

Готовят рабочее разведение, соответствующее утроенному титру, указанному на ампуле (этикетке) гемолитической сыворотки (АО НПО «Микроген»). Например, 1:400 (при титре ге-

молитической сыворотки 1:1200): к 10 мл Разбавителя добавляют 0,025 мл гемолитической сыворотки из ампулы.

Хранение рабочего разведения: при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

2.1.8. Эритроциты барана.

Используют дефибринированную свежую кровь барана. Кровь у барана берут из яремной вены стерильной иглой во флакон со стеклянными бусами. Флакон с кровью непрерывно встряхивают вручную для дефибринирования крови. Дефибринированную кровь фильтруют через 2-3 слоя марли. Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 8 сут.

Для получения эритроцитов непосредственно перед использованием необходимое количество крови центрифугируют при 1800-2000 об/мин в течение 8-10 мин. Осадок эритроцитов трижды отмывают, ресуспендируя в 10-15 кратном количестве раствора натрия хлорида 0,9 % и осаждая центрифугированием при 1800-2000 об/мин в течение 10-15 мин.

Готовят 2 % взвесь эритроцитов: к 9,8 мл Разбавителя добавляют 0,2 мл эритроцитов из осадка. Взвесь эритроцитов хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут.

2.1.9. Гемолитическая система (гемсистема).

Смесь равных объемов гемолитической сыворотки в рабочем разведении и 2 % взвеси эритроцитов: ингредиенты смешивают, приливая сыворотку ко взвеси эритроцитов, и прогревают в термостате при температуре от 36 до 38 °С в течение 30 мин, встряхивая каждые 10-15 мин. Используют сразу после приготовления. Гемсистему готовят дважды: в день титрования комплемента и в день учета результатов.

2.2. Проведение анализа.

2.2.1. Титрование комплемента.

В пробирках готовят ряд разведений комплемента (см. Таблицу 2): исходные – 1:10, 1:15, 1:25 – соединяя 0,3; 0,2 и 0,1 мл комплемента с 2,7; 2,8 и 2,4 мл Разбавителя соответственно. Из исходных концентраций комплемента, соединяя их и Разбавитель в равных объемах (по 1 мл), готовят разведения 1:20, 1:30, 1:50, и из них точно так же – разведения 1:40, 1:60, 1:100 и т.д.

Таблица 2

Разведение комплемента

Ингредиенты	Номера пробирок											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Абсолютные разведения комплемента	1:10	1:15	1:20	1:25	1:30	1:40	1:50	1:60	1:80	1:100	1:120	1:160
Разбавитель, мл	2,7	2,8	1,0	2,4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Комплемент, мл	0,3	0,2	1,0 из 1-й пр.	0,1	1,0 из 2-й пр.	1,0 из 3-й пр.	1,0 из 4-й пр.	1,0 из 5-й пр.	1,0 из 6-й пр.	1,0 из 7-й пр.	1,0 из 8-й пр.	1,0 из 9-й пр.

В соответствии с Таблицей 3 в 2 ряда лунок планшета для иммунологических реакций вносят по 0,025 мл Разбавителя, по 0,025 мл компонента в разведениях, начиная с наибольшего, по 0,025 мл диагностикума КЭ в разведении 1:8. Ставят контроль гемсистемы: в 2-3 лунки вносят по 0,075 мл Разбавителя. Планшет помещают в термостат при температуре от 36 до 38 °С на 30 мин, после чего во все лунки добавляют по 0,05 мл гемсистемы, планшет встряхивают в горизонтальной плоскости, выдерживают при температуре от 36 до 38 °С в течение 30 мин, встряхивая через каждые 10-15 мин.

Таблица 3

Титрование компонента: соединение ингредиентов и результаты

Ингредиенты	Номера рядов	Ингредиенты, мл Разведения компонента (в обратных величинах)												Контроль гемсистемы
		10	15	20	25	30	40	50	60	80	100	120	160	
Диагностикум КЭ (1:8)	1	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	
		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	
	2	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	
		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	
Разбавитель	1-2	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,075
Гемсистема	1-2	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Результаты реакции	1	—	—	—	—	—	—	—	—	+1	+2	+3	+4	+4
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	+2	+2	+3	+4	+4

Результаты учитывают по 4-крестовой системе при условии полной задержки гемолиза в лунках контроля гемсистемы:

- плюс 4 (+4) – полная задержка гемолиза;
- плюс 3 (+3) – гемолиз незначительной массы эритроцитов (25 %);
- плюс 2 (+2) – гемолиз половины эритроцитов (50 %);
- плюс 1 (+1) – гемолиз основной массы эритроцитов (75 %);
- минус (–) – гемолиз всей массы эритроцитов (полный гемолиз).

За единицу компонента (1 ед.) принимают его разведение в последней лунке с полным гемолизом. В нашем примере (Таблица 3) 1 ед. компонента соответствует разведению 1:60; 2 ед. – разведению 1:30.

2.2.2. Определение титров антител к вирусу КЭ в исследуемых образцах.

Линейное титрование исследуемых образцов.

Определяют титры антител к вирусу клещевого энцефалита исследуемых и контрольных образцов. У больных одновременно титруют парные образцы сыворотки (или плазмы). Соедине-

ние ингредиентов при линейном титровании проводят в соответствии с Таблицей 5. Повышающиеся двукратные разведения исследуемых и контрольных образцов готовят в планшете: в 4 ряда лунок, начиная со вторых, вносят по 0,025 мл Разбавителя, в первую и вторую лунки каждого ряда вносят по 0,025 мл соответствующей пробы в исходном разведении 1:4 или 1:8. Перемешивают и переносят при помощи пипетки так, как описано выше, добавляют в каждую лунку по 0,025 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении 1:8 и по 0,025 мл комплемента в разведении, содержащем 2 ед. (например, 1:30).

Одновременно ставят контроли:

- контроль исследуемых и контрольных образцов на антикомплементарность – в лунку вносят по 0,025 мл образца в исходном разведении, 0,025 мл Разбавителя, 0,025 мл комплемента;
- контроль диагностикума КЭ на антикомплементарность – в лунку вносят по 0,025 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении, Разбавителя, комплемента;
- контроль диагностикума КЭ на гемотоксичность – в лунку вносят 0,025 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении и 0,05 мл Разбавителя;
- контроль гемсистемы – в 2-3 лунки вносят по 0,075 мл Разбавителя;
- контроль 4 КСЕ диагностикума КЭ – в лунках планшета (или вспомогательных пробирках) готовят разведения диагностикума КЭ на Разбавителе (от 1:8 до 1:64), затем в лунках планшета соединяют по 0,025 мл каждого из разведений диагностикума КЭ с 0,025 мл К⁺ РСК в 4-кратном титре (в нашем примере в разведении 1:16) и 0,025 мл комплемента.

Ставят контроль доз комплемента, использованных для анализа:

- 1) из рабочего разведения комплемента, содержащего 2 ед., готовят разведения, содержащие 1,5 ед.; 1 ед.; 0,5 ед. (соединение ингредиентов см. в Таблице 4);
- 2) соединяют по 0,025 мл диагностикума КЭ в рабочем разведении, 0,025 мл каждого из разведений комплемента, 0,025 мл Разбавителя (см. Таблицу 5).

Таблица 4

Приготовление рабочих разведений комплемента

Ингредиенты	Разведения комплемента, ед.		
	1,5	1	0,5
Комплемент в рабочем разведении 2 ед.	1 мл	1 мл	1 мл
Разбавитель	0,33 мл	1 мл	3 мл

Планшет встряхивают в горизонтальной плоскости, выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 18-20 ч. После этого во все лунки вносят по 0,05 мл гемсистемы, встряхивают и выдерживают при температуре от 36 до 38 °С в течение 30-40 мин (каждые 10-15 мин встряхивают), затем учитывают результаты.

Таблица 5

*Внесение ингредиентов в лунки планшета для иммунологических реакций в опыте РСК
(линейное титрование сывороток и контрольных образцов)*

Ингредиенты, мл	Разведения ингредиентов	Ингредиенты, мл				Контроль 4 КСЕ диагностикума КЭ				Контроль доз комплемента				Контроль гемсистемы	Контроль исследуемых и контрольных образцов на антикомплемментарность											
						Разведения диагностикума КЭ				Разведение комплемента																
		Диагностikum 1:8	Комплект 2 ед.	Разбавитель	Гемсистема	1:8	1:16	1:32	1:64	2 ед.	1,5 ед.	1 ед.	0,5 ед.													
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16											
Исследуемый образец I	1:4	0,025	0,025		0,05																					
		0,025																								
	1:8	0,025	0,025		0,05																					
		0,025																								
Исследуемый образец II	1:8	0,025	0,025		0,05																					
		0,025																								
	1:16	0,025	0,025		0,05																					
		0,025																								
К ⁺ РСК	1:16	0,025	0,025		0,05																					
		0,025																								
	1:32	0,025	0,025		0,05																					
		0,025																								
К ⁺ РСК	1:64	0,025	0,025		0,05																					
		0,025																								
	1:128	0,025	0,025		0,05																					
		0,025																								

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
К ⁻ РСК	1:8 1:16	0,025 0,025 0,025 0,025	0,025 0,025		0,05 0,05										
Контроль на антикомплемментарность:															
Исследуемый образец I	1:4		0,025	0,025	0,05										0,025
Исследуемый образец II	1:8		0,025	0,025	0,05										0,025
К ⁺ РСК	1:16		0,025	0,025	0,05										0,025
К ⁻ РСК	1:8		0,025	0,025	0,05										0,025
Контроль диагностикума КЭ:															
На антикомплемментарность		0,025	0,025	0,025	0,05										
На гемоглобиносичность		0,025		0,05	0,05										
Контроль 4 КСЕ диагностикума КЭ:															
К ⁺ РСК	1:8 1:8 1:8 1:8		0,025 0,025 0,025 0,025		0,05 0,05 0,05 0,05	0,025 0,025	0,025 0,025								
Контроль доз комплемента		0,025 0,025 0,025 0,025		0,025 0,025 0,025 0,025	0,05 0,05 0,05 0,05					0,025	0,025	0,025	0,025		

3. Реакция радиального гемолиза в геле.

3.1. Подготовка реагентов для анализа.

3.1.1. Фосфатный буферный раствор (ФБР) pH 7,2-7,3.

Для приготовления раствора используют реактивы:

- натрия хлорид (ГОСТ 4233) – 8,0 г;
- калия хлорид (ГОСТ 4234) – 0,2 г;
- калия дигидрофосфат/калий фосфорнокислый однозамещенный (ГОСТ 4198) – 0,2 г;
- динатрия гидрофосфат додекагидрат /натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный (ГОСТ 4172) – 2,9 г;
- вода очищенная (ФС.2.2.0020.18) или вода дистиллированная (ГОСТ Р 58144), (далее – вода) – до 1 л.

pH должен быть 7,2-7,3. Определяют потенциометрически. ФБР используют для отмывания эритроцитов и приготовления агарозного геля.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

3.1.2. Боратный буферный раствор pH 9,00±0,05.

Для приготовления раствора используют реактивы:

- натрия хлорид – 0,7 г;
- кислота борная (ГОСТ 9656) – 0,32 г;
- 4 % раствор натрия гидроксида – 2-2,2 мл;
- вода – до 100 мл.

pH боратного буферного раствора доводят до 9,00±0,05 добавлением 4 % раствора натрия гидроксида. Определяют потенциометрически. Используют для приготовления рабочего раствора.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

3.1.3. Рабочий раствор (РР) – смесь боратного буферного раствора pH 9,00±0,05, фосфатного буферного раствора № 1 (pH 5,8) и фосфатного буферного раствора № 2 (pH 7,0).

В состав фосфатного буферного раствора № 1 входят:

- натрия хлорид – 0,88 г;
- натрия дигидрофосфат дигидрат /натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный (ГОСТ 245) – 2,86 г;
- динатрия гидрофосфат додекагидрат /натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный – 0,6 г;
- вода – до 100 мл.

В состав фосфатного буферного раствора № 2 входят:

- натрия хлорид – 0,88 г;

- натрия дигидрофосфат дигидрат /натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный – 1,24 г;
- динатрия гидрофосфат додекагидрат /натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный – 4,3 г;
- вода - до 100 мл.

Для приготовления растворов № 1 и № 2 реактивы в указанных количествах растворяют в воде. Для приготовления РР соединяют 10 частей боратного буферного раствора, 8 частей фосфатного буферного раствора № 1 и 2 части фосфатного буферного раствора № 2. рН раствора, контролируемый потенциометрически, должен быть $6,20 \pm 0,05$. РР стерилизуют в автоклаве при температуре $(120 \pm 1)^\circ\text{C}$ и давлении пара $(0,10 \pm 0,01)$ МПа в течение 30 мин.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C не более 14 сут.

3.1.4. Эритроциты барана.

Используют свежеприготовленную дефибрированную кровь (см. п. 2.1.8). Эритроциты осаждают и трижды отмывают в 3-4-кратном объеме раствора натрия хлорида 0,9 % рН 7,2-7,4, центрифугируя при 1800-2000 об/мин в течение 10-15 мин. Готовят 10 % взвесь эритроцитов на растворе натрия хлорида 0,9 %. Взвесь хранят в широкодонных колбах толщиной слоя не более 3 см при температуре от 2 до 8°C не более 3 сут.

3.1.5. Комплемент.

Для постановки РРГ пригоден «Комплемент сухой» (АО «НПО «Микроген») с активностью не ниже разведения 1:60 (см. постановку РСК). В ампулу вносят раствор натрия хлорида 0,9 % до объема, указанного на ампуле (этикетке). Используют в течение 1 сут.

3.1.6. Диагностикум КЭ.

В ампулу с диагностикумом КЭ вносят 1 мл воды. Выдерживают 1-1,5 ч при температуре от 2 до 8°C для стабилизации.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C не более 7 сут.

3.1.7. K^+ РСК.

В ампулу с K^+ РСК вносят 0,5 мл воды. K^+ РСК в количестве 0,1 мл прогревают 30 мин при температуре $59-61^\circ\text{C}$.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C не более 7 сут.

3.1.8. K^- РСК.

В ампулу с K^- РСК вносят 0,5 мл воды. Прогревают и хранят так же, как K^+ РСК.

3.1.9. Исследуемые образцы.

Нативные сыворотки (плазмы) крови человека в количестве 0,1 мл прогревают так же, как для РСК (см. раздел «АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ») без предварительного разведения Разбавителем.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

3.1.10. Раствор калия метапериодата в концентрации 0,001 М.

Навеску 0,023 г калия метапериодата по ТУ 6-09-02-364-83 растворяют в 100 мл РР.

Хранение: в темной посуде при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

3.1.11. Раствор борной кислоты 1 %. Навеску борной кислоты 1 г растворяют в 100 мл РР.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С, срок хранения не ограничен.

3.1.12. Сенсibilизация эритроцитов барана.

1,66 мл 10 % суспензии эритроцитов отмывают один раз в ФБР pH 7,2-7,3. К осадку отмытых эритроцитов добавляют 1,5 мл РР и 0,7 мл 0,001 М раствора калия метапериодата, перемешивают, выдерживают при температуре от 36 до 38 °С в течение 10 мин, затем дважды отмывают в 10-кратном объеме ФБР pH 7,2-7,3. Эритроциты осаждают центрифугированием при 1800-2000 об/мин в течение 10-15 мин, надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 1,5 мл РР. Полученную взвесь эритроцитов смешивают с 0,55 мл диагностикума КЭ, выдерживают при температуре от 18 до 25 °С в течение 10-15 мин, после чего эритроциты трижды отмывают в ФБР pH 7,2-7,3 так, как описано выше. К осадку эритроцитов добавляют 1,5 мл РР и 0,2-0,25 мл комплемента.

3.1.13. Приготовление агарозного геля. Для приготовления агарозного геля в одной чашке Петри диаметром 100 мм необходимо 0,07 г агарозы; 1,66 мл 10 % взвеси эритроцитов; 0,55 мл диагностикума КЭ; 0,20-0,25 мл комплемента; 0,1 мл 1 % раствора борной кислоты.

Подготовка агарозы.

К 0,07 г агарозы в стакане (флаконе) вместимостью 50-100 мл добавляют 13,8 мл ФБР pH 7,2-7,3 и кипятят на водяной бане 5-7 мин до полного расплавления агарозы. Расплавленную агарозу охлаждают до 42 °С и вносят 0,1 мл 1 % раствора борной кислоты.

Заливка чашек Петри.

Сенсибилизированные эритроциты, подготовленные так, как описано в п. 3.1.12., выливают в стакан (флакон) с расплавленной и охлажденной до 42 °С агарозой, смесь немедленно перемешивают до однородного состояния и заливают в чашку Петри, установленную горизонтально по уровню. Толщина пласта агарозного геля должна быть 2-3 мм. После застывания геля (через 3-5 мин) чашку закрывают крышкой и переворачивают на 30-40 мин для уплотнения геля. В застывшем слое агарозы металлической или стеклянной трубкой диаметром $(2,00 \pm 0,05)$ мм вырезают 20-40 лунок на расстоянии 13-20 мм друг от друга и отсасывают гель. Для выполнения этих манипуляций может служить игла для взятия крови диаметром 2 мм с отпиленным концом, соединенная с грушей.

3.2. Проведение анализа РРГ.

В лунки вносят по 5 мкл исследуемых образцов, а также контрольные образцы: K^+ РСК и K^- РСК. Чашку закрывают крышкой и выдерживают при температуре от 2 до 8 °С в течение 18-20 ч, а затем при температуре от 36 до 38 °С в течение 1,5-2,5 ч.

Параллельно с основным опытом ставят контрольный опыт на агарозной пластинке с не-сенсibilизированными эритроцитами для исключения неспецифического гемолиза. Подготовку эритроцитов для контрольного опыта проводят так же, как для основного, но их не соединяют с диагностикумом КЭ.

РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты РТГА, РСК, РРГ учитывают визуально.

Учет результатов в РТГА.

После добавления взвеси эритроцитов и экспозиции 30-45 мин учитывают результаты реакции. При наличии антител к вирусу КЭ в образце происходит торможение гемагглютинации. В этом случае эритроциты оседают на дне «пуговкой». При отрицательных результатах (отсутствии антител к вирусу КЭ) агглютинированные эритроциты прилипают к стенкам лунок в виде «зонтика».

Реакцию учитывают, если:

- наблюдается полное оседание эритроцитов (–) в контролях эритроцитов на спонтанную агглютинацию, контролях исследуемых и контрольных образцов на полноту удаления неспецифических гемагглютининов;
- наблюдается гемагглютинация не менее чем на +3 в контроле рабочего разведения диагностикума КЭ в трех последовательных разведениях, а также в контролях исследуемых и контрольных образцов на полноту удаления ингибиторов гемагглютинации.

За титр исследуемого или контрольного образца принимают их максимальное разведение, дающее полную (–) задержку гемагглютинации с 8 ГАЕ диагностикума.

В Таблице 6 приведен пример результатов РТГА. Титр K^+ РТГА – 1:320, исследуемого образца II – 1:40, исследуемый образец I и K^- РТГА не содержат антител к вирусу КЭ, реакция специфична, использовано 8 ГАЕ диагностикума КЭ.

Специфическим считают титр антител 1:20 и выше, сомнительным – 1:10. У больных диагностическим считают нарастание титра антител в парных исследуемых образцах в 4 раза и больше.

Таблица 6

Примерный протокол РТГА

Наименование рядов	Разведения исследуемых и контрольных образцов, -диагностикума КЭ (в обратных величинах)							Контроль исследуемых и контрольных образцов на полноту удаления неспецифических гемагглютининов	Контроль исследуемых и контрольных образцов на полноту удаления ингибиторов гемагглютинации
	10	20	40	80	160	320	640		
К ⁺ РТГА	—	—	—	—	—	—	+4	—	+4
Исследуемый образец I	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	—	+4
Исследуемый образец II	—	—	—	+4	+4	+4	+4	—	+4
К ⁻ РТГА	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	—	+4
Контроль рабочего разведения диагностикума КЭ				+4	+4	+4	—		
				+4	+4	+4	—		
				+4	+4	+4	—		
Контроль эритроцитов	—	—	—						

Учет результатов в РСК.

Результаты РСК (опыта линейного титрования) учитывают по 4-крестовой системе, если наблюдаются следующие результаты в контрольных лунках:

- полная задержка гемолиза в лунках контроля гемсистемы, а также контроля диагностикума КЭ на гемотоксичность;
- полный гемолиз в лунках контролей на антикомплемментарность исследуемых образцов, контрольных образцов и диагностикума КЭ;
- в контроле доз комплемента (см. Таблицу 7) результаты соответствуют вариантам III или IV (т.е. рабочее разведение, использованное в реакции, содержит 1,5 ед. комплемента).

Таблица 7

Пример учета результатов РСК
в зависимости от результатов контроля доз комплемента

Варианты результатов контроля	Разведение комплемента, в ед.				Примечание
	2	1,5	1	0,5	
I	—	—	—	—; +1	Опыт не учитывают
II	—	—	—	+2; +3; +4	Опыт не учитывают
III	—	—; +1	+2; +3; +4	+2; +3; +4	Опыт учитывают
IV	—	+2; +3; +4	+2; +3; +4	+4	Опыт учитывают

K ⁺ РСК	1:16	+4			—		+4	+4	+4	+2		
	1:32	+4										
	1:64	+4										
	1:128	—										
K ⁻ РСК	1:8	—				—						
	1:16	—										
Контроль диагностики КЭ на антикомплементажность		—										
Контроль диагностики КЭ на гемотоксичность		+4										
Комплемент	2 ед										—	
	1,5 ед										—	
	1 ед										+2	
	0,5 ед										+4	
Гемсистема												+4

Учет результатов в РРГ.

Результаты учитывают визуально, просматривая чашки Петри в проходящем свете при снятой крышке. Положительный результат, свидетельствующий о наличии специфических антител в исследуемых образцах и положительном контрольном образце – прозрачная зона гемолиза диаметром не менее 4 мм вокруг лунки, в центре которой иногда остаются нелизированные эритроциты. Отрицательный результат – полное отсутствие зоны гемолиза вокруг лунки с сывороткой.

Реакцию считают специфичной, если в основном опыте K⁺ РСК дает положительный результат, K⁻ РСК – отрицательный. При этом в контрольном опыте с несенсибилизированными эритроцитами гемолиза быть не должно. Причиной неспецифического гемолиза может быть обсемененность исследуемых образцов, для исследования таких образцов рекомендуется добавлять в них 1 % раствор борной кислоты в количестве 1-2 капли на 2-4 мл сыворотки.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ИЗДЕЛИЯ

Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Хранение изделия в упаковке изготовителя должно производиться в течение всего срока годности при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Хранение компонентов после вскрытия см. раздел «СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ».

Срок годности – 3 года со дня приемки. Изделие с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей инструкции по применению.

Рекламации по вопросам, касающимся качества и обращения медицинского изделия в течение срока годности, с обязательным указанием номера серии и срока годности следует направлять в адрес Акционерного общества «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» (АО «НПО «Микроген»): Россия, 115088, г. Москва, 1-я Дубровская ул., д. 15, строение 2, тел. (495) 710-37-87, e-mail: info@microgen.ru и в адрес производства: Россия, 634040, Томская область, г. Томск, ул. Ивановского, д. 8, тел. (3822) 63-37-34.

Взамен инструкции утвержденной 25.04. 2018 г.