

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации

Г. Г. Онищенко
«15» 01/12/2008 г.

№ 01-11/5-10

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
“ДС-ИФА-АНТИ-HAV-M-РЕКОМБ”

**Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgM
к вирусу гепатита А на основе рекомбинантных антигенов**

Состав набора:

Иммуносорбент – рекомбинантные антигены, аналоги структурных и неструктурных белков вируса гепатита А (HAV): структурный нуклеокапсидный белок VP4-VP2 и неструктурные белки VP1-P2A и P3C, сорбированные на strips полистиролового 96-луночного планшета разборного;

Конъюгат (концентрат x 11), жидкий – моноклональные антитела мыши к иммуноглобулину М человека, конъюгированные с пероксидазой хрена;

К+ - контрольный положительный образец, жидкий – сыворотка крови человека, инактивированная, содержащая антитела класса Ig M к вирусу гепатита А (анти-HAV-M), не содержащая HBsAg, антиген ВИЧ-1 (p24), антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С;

К- - контрольный отрицательный образец, жидкий – сыворотка крови человека, инактивированная, не содержащая анти-HAV-M, не содержащая HBsAg, антиген ВИЧ-1 (p24), антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С;

БР - блок-раствор для разведения сывороток;

РРК - раствор для разведения конъюгата;

ПР (концентрат x 25) – промывочный раствор;

СБ - субстратный буферный раствор;

ТМБ - хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, жидкий;

Стоп-реагент – 0,75 М водный раствор серной кислоты.

Набор рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора.

Описание реагентов набора:

Иммуносорбент – разборный 96-луночный полистироловый планшет с прозрачными бесцветными лунками;

Конъюгат (концентрат х 11) - прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость;

К+ (контрольный положительный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость;

К- (контрольный отрицательный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость;

РРК - при температуре от 2 до 8 °С – прозрачная желтого цвета жидкость, при температуре от 18 до 24 °С реагент становится опалесцирующим;

БР – прозрачная, слегка опалесцирующая фиолетово-синего цвета жидкость;

ПР (концентрат х 25) – прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании;

СБ - прозрачная бесцветная жидкость;

ТМБ - прозрачная бесцветная жидкость;

Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость.

Назначение

Набор предназначен для выявления антител класса IgM к вирусу гепатита А в сыворотке (плазме) крови человека. Данная тест-система позволяет выявлять больных в острой фазе инфекции (2-3 месяца) и дифференцировать их от поздних

реконвалесценто́в гепатита А.

Меры безопасности

Для изготовления контрольных образцов набора использованы термоинактивированные сыворотки. При работе с набором в лаборатории с исследуемыми образцами сывороток (плазмы) крови человека обращаться, как с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, в спецодежде, не пипетировать ртом. Твёрдые отходы (использованные планшеты, наконечники к пипеткам, флаконы из-под компонентов, лабораторную посуду и т. д.) обеззараживать погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства (СМС) или в 3 % раствор хлорамина Б или другого разрешенного к применению дез. средства. Длительность дезактивации - не менее 1 ч. Твёрдые отходы можно обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывные воды) обезвреживать добавлением сухого хлорамина Б из расчёта 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа) и при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.

Способ применения

Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока их годности!

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при температуре от 18 до 24 °С. Внимание! Иммуносорбент необходимо выдержать в закрытом пакете во избежание конденсации влаги в лунках планшета.

Все растворы необходимо отбирать новыми одноразовыми наконечниками, не допускать касания жидкости в наконечнике краем дозатора!

Для отбора проб использовать калиброванные пипетки переменного объема

(одно- и многоканальные) с погрешностью измерения не более 5 %.

Посуду для работы с субстратной смесью (ванночки, флаконы и т.д.) в случае повторного использования необходимо сразу после работы промыть 70% раствором этилового спирта, а затем водой дистиллированной.

1. Перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых для постановки ИФА.

1. Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм.
2. Пипетки переменного объема (одно- и многоканальные).
3. Наконечники одноразовые для пипеток переменного объема.
4. Термостат.
5. Устройство для промывания планшетов (вошер).
6. Вода дистиллированная.
7. Бумага фильтровальная лабораторная.
8. Перчатки медицинские.

2. Приготовление рабочих растворов.

Объёмы реагентов для проведения анализа на необходимом количестве стрипов или на целом планшете приведены в таблиц № 1.

Таблица 1

Расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов при постановке ИФА

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц. x25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. x 11) (мл)	РРК (мл)	СБ (мл)	ТМБ (мл)
1	4,0	96,0	0,1	1,0	1,0	0,05
2	8,0	192,0	0,2	2,0	2,0	0,10
3	12,0	288,0	0,3	3,0	3,0	0,15
4	16,0	384,0	0,4	4,0	4,0	0,20
5	20,0	480,0	0,5	5,0	5,0	0,25
6	24,0	576,0	0,6	6,0	6,0	0,30

7	28,0	672,0	0,7	7,0	7,0	0,35
8	32,0	768,0	0,8	8,0	8,0	0,40
9	36,0	864,0	0,9	9,0	9,0	0,45
10	40,0	960,0	1,0	10,0	10,0	0,50
11	44,0	1056,0	1,1	11,0	11,0	0,55
12	48,0	1152,0	1,2	12,0	13,0	0,65

ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимое количество концентрата промывочного раствора отобрать в отдельную ёмкость и добавить соответствующее количество воды дистиллированной (согласно табл. № 1). Полученный раствор тщательно перемешать.

Хранение: рабочий промывочный раствор хранить не более 3-х сут при температуре от 2 до 8 °С.

К+ - контрольный положительный образец, готов к применению.

К- - контрольный отрицательный образец, готов к применению.

БР - раствор для разведения образцов, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

РРК - раствор для разведения конъюгата, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

Конъюгат, рабочий раствор, готовить перед использованием. Необходимое количество РРК перенести в чистый флакон, добавить соответствующее количество тщательно перемешанного концентрата конъюгата (согласно табл. № 1) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!).

Хранение: рабочий раствор конъюгата стабилен не более 12 ч при хранении в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в чистых флаконах.

ТМБ - хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин для приготовления субстратной смеси, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона

тщательно перемешать.

СБ - субстратный буферный раствор для приготовления субстратной смеси, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

СС - субстратная смесь, готовить перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (согласно табл. № 1), тщательно перемешать до полного растворения.

Хранение: допустимо хранение СС не более 10 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в чистых флаконах.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

Стоп – реагент - готов к применению.

Хранение реагентов. После вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными реагенты набора (ПР (концентрат x 25), конъюгат (концентрат x 11), К-, К+, БР, РРК, СБ, ТМБ, стоп-реагент) хранить во флаконах, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

3. Подготовка исследуемых образцов.

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 72-х ч. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Образцы с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией могут дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо «осветлять» центрифугированием.

4. Проведение ИФА.

4.1. Вскрыть фольгированный пакет с иммуносорбентом, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов. Пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

Перед использованием иммуносорбент не промывать.

4.2. При внесении контрольных образцов в зависимости от количества используемых стрипов рекомендуется следующая схема:

1 стрип - 1 лунка К+ и 2 лунки К-

2 стрипа - 2 лунки К+ и 2 лунки К-

3 стрипа и более - 2 лунки К+ и 3 лунки К-.

Например, при постановке ИФА на двух стрипах: в 2 лунки иммуносорбента дозатором пипеточным внести 100 мкл К+, в 2 лунки – по 100 мкл К-. В остальные лунки внести по 90 мкл БР и по 10 мкл образцов исследуемых сывороток (сыворотки в лунках разведены в 10 раз). Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием, при этом фиолетово - синий цвет содержимого лунок должен измениться на голубовато-зеленый.

Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С.

4.3. Содержимое лунок удалить аккуратно, с помощью промывочного устройства в ёмкость для сбора инфицированного материала, затем планшет промыть 6 раз ПР, заливая его до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдерживая 40 сек удалить промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала.

4.4. Во все лунки стрипов внести по 100 мкл конъюгата в рабочем разведении и покрытый крышкой или защитной пленкой планшет выдержать в термоста-

те 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

4.5. Содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала, затем планшет промыть 6 раз рабочим ГР (см. п. 4.3).

4.6. Во все лунки стрипов внести по 100 мкл СС и выдержать планшет 20 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 $^\circ\text{C}$.

4.7. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и немедленно провести учёт результатов.

5. Учёт результатов.

Учет результатов провести спектрофотометрически при двух длинах волн – 450 нм и при референс-длине в диапазоне от 620 до 680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учёт результатов при одной длине волны – 450 нм. Реакцию учитывать, если значение ОП в лунке с К+ - не менее 1,0, а среднее значение в лунках с К- - не более 0,2. Положительными считают образцы со значениями ОП, превышающими критическое значение ОП (ОП крит.). ОП крит. рассчитывают по формуле:

$$\text{ОП крит.} = \text{ср. знач. ОП К-} + A,$$

где А - коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов на предприятии-изготовителе, величину которого указывают в рабочей инструкции и паспорте на набор данного препарата.

Форма выпуска

Иммуносорбент	1 шт.
Конъюгат (концентрат x 11)	1,5 мл – 1 фл.
К-, инактивированный	3,0 мл – 1 фл.
К+, инактивированный	1,5 мл – 1 фл.
БР	12,5 мл – 1 фл.
РРК	12,5 мл – 1 фл.
ГР (концентрат x 25)	50,0 мл – 1 фл.
СБ	15,0 мл – 1 фл.
ТМБ	1,5 мл – 1 фл.
Стоп-реагент	25,0 мл – 1 фл.

Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают инструкцию по применению. Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка для ИФА планшетов;
- одноразовые наконечники;
- пластиковая ванночка для жидких реагентов;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом.

Срок годности. Условия транспортирования и хранения

Срок годности набора - 12 месяцев.

По истечении срока годности препарат использованию не подлежит.

Транспортирование наборов должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

Набор должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности.

Условие отпуска - для диагностики «in vitro». Только для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора Россия, 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел.: (499) 241-39-22, факс: (499) 241-92-38 и предприятию-изготовителю - ООО «Научно производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 603093, Нижний Новгород, ул. Яблонева, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12, 8-800-555-0300.

E-mail: info@npods.nnov.ru; www.npods.ru.

**Директор по производству ООО
«Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»**



В.К. Пименов