

УТВЕРЖДАЮ

**Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации**

И. Г. Онищенко
2012 г.

1
«25»

№

01-11/42-10

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-анти-Rubella-G»**

**Тест-система иммуноферментная для качественного и количественного
определения антител класса IgG к вирусу краснухи**

СОГЛАСОВАНО

И.о директора ФГУН ГИСК

им. Л.А. Тарасевича

Роспотребнадзора

И. В. Борисевич

« 18 » 08 2010 г.



Содержание

I. Назначение.....	3
II. Состав набора «ДС-ИФА-анти-Rubella-G».....	3
III. Условия проведения иммуноферментного анализа	4
IV. Меры по безопасности.....	5
V. Необходимые материалы и оборудование, не предоставляемые с набором реагентов.....	5
VI. Подготовка образцов.....	6
VII. Подготовка реагентов.....	6
VIII. Проведение анализа.....	7
IX. Результаты.....	8
X. Срок годности. Условия хранения и транспортировки	9
XI. Объяснение символов на внутренней упаковке.....	10

Набор рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки или для одновременной постановки 96 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа. При ручной постановке качественного анализа возможно дробное (по одному стрипу) использование набора, при ручной постановке количественного анализа возможно дробное (по два стрипа) использование набора.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-анти-Rubella-G» предназначен для качественного и количественного определения антител класса Ig G к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови человека.

II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-анти-Rubella-G»

Реагент	
Иммуносорбент - планшет полистироловый 96-луночный разборный с прозрачными бесцветными лунками, в которых сорбирован рекомбинантный антиген, представляющий собой вирусоподобную частицу, содержащую три структурных белка: core-белок и два поверхностных гликопротеина E1 и E2.	1 шт.
Конъюгат (концентрат x 21) – моноклональные антитела мыши к иммуноглобулину G человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 0,75 мл
K ₁ + - (контрольный положительный образец), жидкий - сыворотка крови человека, инактивированная, содержащая антитела класса Ig G к вирусу краснухи в концентрации 10 МЕ/мл, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С. Прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость.	1 флакон 2,5 мл.
K ₂ + - (контрольный положительный образец), жидкий - сыворотка крови человека, инактивированная, содержащая антитела класса Ig G к вирусу краснухи в концентрации 40 МЕ/мл, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С. Прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
K ₃ + - (контрольный положительный образец), жидкий - сыворотка крови человека, инактивированная, содержащая антитела класса Ig G к вирусу краснухи в концентрации 80 МЕ/мл, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С. Прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
K ₄ + - (контрольный положительный образец), жидкий - сыворотка крови человека, инактивированная, содержащая антитела класса Ig G к вирусу краснухи в концентрации 160 МЕ/мл, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С. Прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
K- (контрольный отрицательный образец), жидкий - сыворотка крови человека инактивированная, не содержащая антитела класса Ig G к вирусу	1 флакон 2,5 мл

краснухи, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С. Прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	
PPC - раствор для предварительного разведения сывороток. Прозрачная сине-фиолетового цвета жидкость.	1 флакон 12,5 мл
БР - блок-раствор для рабочего разведения сывороток. Прозрачная розового цвета жидкость, допустимо образование осадка, распадающегося при встряхивании.	1 флакон 12,5 мл
РРК - раствор для разведения конъюгата. Прозрачная или слегка опалесцирующая жёлтого цвета жидкость; допустимо образование осадка распадающегося при встряхивании.	1 флакон 13,5 мл
ПР (концентрат х 25) – промывочный раствор. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании	1 флакон 50,0 мл
СБ - субстратный буферный раствор. Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон 15,0 мл.
ТМБ - хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 1,5 мл
Стоп-реагент – 0,75 М водный раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон 25,0 мл

Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают инструкцию по применению, планшет для разведения сывороток, бланк для построения калибровочной кривой.

Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или	1 шт.
	защитная пленка для планшетов	2 шт
	Одноразовые наконечники	16 шт.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.
	Пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или пакет полиэтиленовый с замком zip-lock.	1 шт.

III. УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с температурой от 18 до 24 °С.
- Нельзя использовать реагенты с истекшим сроком годности.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий и смешивать их в процессе приготовления растворов.
- Перед использованием все реагенты выдержать при температуре от 18 до 24 °С в течение 30 мин.
- Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить тест в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на ферментативную активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть чистой или одноразового использования.
- Нельзя допускать высыхания лунок планшета во время проведения анализа.
- Ферментативная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстратов.
- Необходимо использовать новый наконечник для каждого образца.

- Необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполнены, не допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.

- Нельзя использовать одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и других реагентов.

- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование.

- Необходимо использовать дистиллированную воду.

- Нельзя подвергать реагенты воздействию тепла или света во время инкубации и хранения.

IV. МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для диагностики “in vitro”.

- С исследуемыми образцами следует обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.

- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спец. одежду и одноразовые перчатки.

- Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов. При расплескивании немедленно дезактивировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.

- Не допускать контакта субстратного буфера, хромогена, стоп-реагента с кожей и слизистыми.

- Растворы, остатки биологических образцов, твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства (СМС) или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дез. средства. Твёрдые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 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) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.

Субстратный буферный раствор содержит 0,05 % Проклин 300. Проклин 300 0,05 % - раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промойте область контакта большим количеством мыла и воды.



xi

V. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМОЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Вода дистиллированная.

- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или предварительно устанавливаемые одноканальные или многоканальные пипетки с изменяемым объемом для отбора жидкостей.

- Одноразовые наконечники к пипеткам.

- Фотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения с настройкой «по воздуху».
- Инкубатор микропланшетный ($37,0 \pm 0,5$) °С.
- Автоматический анализатор для иммуноферментного анализа открытого типа.
- Устройство для промывания планшетов (вошер).
- Бумага фильтровальная лабораторная.
- Перчатки медицинские.

VI. ПОДГОТОВКА 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 не более 3 суток при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Сыворотку от эритроцитов или плазму от сгустка следует отделить как можно быстрее, чтобы избежать гемолиза. Исследование образцов с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией не допускается. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 минут при температуре от 4 до 8 °С.

VII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Реагенты готовые к применению:

К₁+ - контрольный положительный образец 1.

К₂+ - контрольный положительный образец 2.

К₃+ - контрольный положительный образец 3.

К₄+ - контрольный положительный образец 4.

К- - контрольный отрицательный образец.

РРК - раствор для разведения конъюгата. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать и отобрать необходимое количество в чистую емкость.

РРС - раствор для предварительного разведения исследуемых сывороток. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать и отобрать необходимое количество в чистую емкость.

БР - блок-раствор для рабочего разведения исследуемых сывороток. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать и отобрать необходимое количество в чистую емкость.

ТМБ - хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин для приготовления субстратной смеси. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

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

Иммуносорбент. Каждый планшет, содержащий 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть пакет и вынуть планшет. Взять нужное количество стрипов. Неиспользованные стрипы без рамки поместить обратно в пакет. После вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 месяца при температуре от 2 до 8 °С, при условии, что пакет герметично закрыт с помощью полиэтиленового пакета с замком Zip-Lock или с помощью скрепки. Силикагель удалять из пакета нельзя.

Приготовление рабочих растворов.

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 и 2). Полученный раствор тщательно перемешать. Хранение: рабочий промывочный раствор хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С.

Конъюгат - рабочий раствор, готовить перед использованием. Необходимое количество РРК перенести в чистую емкость, добавить соответствующее количество тщательно перемешанного концентрата (x 21) конъюгата (согласно табл. 1 и 2) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Хранение: рабочий раствор конъюгата стабилен не более 6 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

СС - субстратная смесь, готовить непосредственно перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (согласно табл. 1 и 2), тщательно перемешать до полного растворения.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

Хранение неиспользованных реагентов

Хранение реагентов: после вскрытия флаконов оставшиеся неиспользованными реагенты набора (ПР (x 25), конъюгат (x 21), К-, К₁+, К₂+, К₃+, К₄+, РРК, БР, РРС, СБ, ТМБ, стоп-реагент) хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 минут при температуре от 18 до 24 °С. Перед использованием иммуносорбент не промывать!

Объёмы реагентов для проведения анализа на необходимом количестве стрипов или на целом планшете приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Расход реагентов набора при постановке ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор (ПР)		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц. x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. x 21) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
12	48,0	1152,0	0,65	13,0	1,2	12,0

Таблица 2

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов при ручной постановке ИФА

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор, мл		Рабочий раствор конъюгата, мл		СС, мл	
	ПР (конц. x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. x 21) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
1	4,0	96,0	0,05	1,0	0,1	1,0
2	8,0	192,0	0,10	2,0	0,2	2,0
3	12,0	288,0	0,15	3,0	0,3	3,0
4	16,0	384,0	0,20	4,0	0,4	4,0
5	20,0	480,0	0,25	5,0	0,5	5,0
6	24,0	576,0	0,30	6,0	0,6	6,0
7	28,0	672,0	0,35	7,0	0,7	7,0
8	32,0	768,0	0,40	8,0	0,8	8,0
9	36,0	864,0	0,45	9,0	0,9	9,0

10	40,0	960,0	0,50	10,0	1,0	10,0
11	44,0	1056,0	0,55	11,0	1,1	11,0
12	48,0	1152,0	0,65	13,0	1,2	12,0

1. Проведение ИФА при ручной постановке.

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (PPC). Для этого в лунки вспомогательного планшета внести многоканальной пипеткой переменного объема по 90 мкл PPC и по 10 мкл образцов исследуемой сыворотки. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием, при этом фиолетово-синий цвет должен измениться на голубовато-зеленый.

1.1 Постановка качественного анализа: при внесении контрольных образцов рекомендуется следующая схема:

2 лунки K₁+, 1 лунка K₄+, 2 лунки K-;

Например: в лунки A-1, B-1 пипеткой переменного объема внести по 100 мкл K₁+, в лунку C-1 – 100 мкл K₄+ и в лунки D-1, E -1 – по 100 мкл K-.

1.2. Постановка количественного анализа: при внесении контрольных образцов рекомендуется следующая схема:

2 лунки K₁+, 2 лунки K₂+, 2 лунки K₃+, 2 лунки K₄+, 2 лунки K-.

Например: в лунки A-1, B-1 пипеткой переменного объема внести по 100 мкл K₁+, в лунки C-1, D-1 - по 100 мкл K₂+, в лунки E-1, F-1 - по 100 мкл K₃+, в лунки G-1, H-1 - по 100 мкл K₄+; A-2, B-2- по 100 мкл K -.

В остальные лунки внести по 90 мкл БР и по 10 мкл предварительно разведенных (в 10 раз) исследуемых образцов сывороток (конечное разведение сывороток в лунках в 100 раз).

Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием, планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в течение 1 ч при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

1.3. Содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала (аккуратно, с помощью промывочного устройства или многоканальной пипетки) и планшет промыть 4 раза рабочим ПР, заливая его до краев лунок (от 380 до 400 мкл в лунку), выдерживая 40 сек и удаляя промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала. Не допускать остатка жидкости в лунках после промывки.

1.4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата в рабочем разведении. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в течение 30 мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

1.5. Содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 5 раз рабочим ПР, как в п. 1.3

1.6. Во все лунки планшета внести по 100 мкл СС и выдержать планшет 30 мин при температуре от 18 до 24 °С в защищённом от света месте.

1.7. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и провести учет результатов.

2. Проведение ИФА в автоматическом режиме.

При постановке тест-системы на автоматическом ИФА - анализаторе следуйте п. VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА. Протоколы для постановки и обсчета результатов тест-системы Вы можете получить в ООО «НПО «Диагностические системы».

IX. РЕЗУЛЬТАТЫ

Учет результатов провести спектрофотометрически при двух длинах волн - 450 нм и при референс-длине волны в диапазоне от 620 до 680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учёт результатов при одной длине волны – 450 нм. Реакцию следует

учитывать, если значения оптической плотности (ОП) в лунках с К- - не более 0,200, с К₁+ – не менее 0,250, с К₄+ – не менее 1,000.

1. При качественном анализе необходимо рассчитать среднее значение оптической плотности образца К₁+ (ОПср. К₁+).

Положительным считать образец со значением ОП, превышающим значение 1,2 x (ОПср. К₁+).

Отрицательным считать образец со значением ОП менее значения 0,8 x (ОПср. К₁+).

Если кровь взята на исследование у больного в начале острой фазы заболевания, уровень специфических антител к вирусу краснухи класса Ig G в сыворотке крови может быть низким. Поэтому при подозрении на наличие инфекции (контакт, клинические проявления) рекомендуется провести анализ на наличие антител к вирусу краснухи класса Ig M, а также повторное исследование сыворотки крови пациента на наличие антител к вирусу краснухи класса Ig G в динамике – через 10-15 дней, провести новый забор крови от пациента и повторить анализ параллельно с первым образцом сыворотки для установления увеличения концентрации специфических Ig G.

Сомнительным считать образец с ОП в интервале:

$$0,8 \times (\text{ОПср. К}_1+) \leq \text{ОП} \leq 1,2 \times (\text{ОПср. К}_1+).$$

Рекомендуется повторить анализ такого образца. При повторном сомнительном результате необходимо проанализировать сыворотку, полученную через 10-15 дней, параллельно с первым образцом сыворотки, чтобы установить увеличение концентрации специфических Ig G.

2. При количественном анализе необходимо рассчитать средние значения ОП К₁+, ОП К₂+, ОП К₃+, ОП К₄+. Построить график зависимости оптической плотности от концентрации антител класса IgG к вирусу краснухи в калибровочных пробах:

Ось абсцисс X – концентрация АТ (С_{АТ}), МЕ/мл - логарифмическая шкала;

Ось ординат Y – оптическая плотность (ОП), О.Е – линейная шкала.

Для образцов, ОП которых больше или равно ОП К₁+, на построенном графике найти точку, соответствующую ОП образца, и опустив перпендикуляр к оси концентраций, определить содержание АТ в образце.

Для удобства расчетов к набору прилагается бланк для построения калибровочного графика в полулогарифмических координатах.

Если значение ОП сыворотки выходит за пределы калибровки (превышает ОП К₄+), то для более точного определения рекомендуется переставить данный образец повторно в большем разведении. Рекомендуемое предварительное разведение – 1:40 (при этом окончательное разведение в лунке составит 1:400), количество антител в образце, таким образом, будет равно полученному в результате анализа значению концентрации антител, умноженному на 4.

Уровень антител класса IgG к вирусу краснухи более 12 МЕ/мл рекомендован как «защитный уровень» - показатель наличия иммунитета к данному вирусу.

Х. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности – 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.




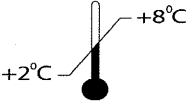



Хранение - в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование - при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование от 9 до 20 °С и не более 10 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу 119002, Россия, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел.: (499) 241-39-22, факс: (499) 241-92-38 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно производственное объединение

«Диагностические системы» 603093, Россия, Нижний Новгород, ул. Яблонева, 22,
 тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.nnov.ru,
www.npods.ru.

XI. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/СЕ по in vitro диагностическим МУ)
	Только для лабораторного использования
	Код партии (номер серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Используйте инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

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



В. К. Пименов