

УТВЕРЖДАЮ

**Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации**

Г.Г. Онищенко

«17»

2010 г.

№ 01-11/34-10

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«ДС-ИФА-анти-Rubella-G-Авидность»

**Тест-система иммуноферментная для определения индекса авидности
антител класса Ig G к вирусу краснухи**

Содержание

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

Набор рассчитан на проведение 48 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по два стрипа) использования набора, или для одновременной постановки 48 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-анти-Rubella-G-Авидность», предназначен для определения индекса авидности антител класса Ig G к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови человека и используется для диагностики острой инфекции.

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

Характеристика реагента	Форма выпуска
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 высокоавидный образец), жидкий - сыворотка крови человека, инактивированная, содержащая высокоавидные антитела класса Ig G к вирусу краснухи 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 ₂ + (контрольный положительный низкоавидный образец), жидкий - сыворотка крови человека, инактивированная, содержащая низкоавидные антитела класса Ig G к вирусу краснухи не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С. Прозрачная или слегка опалесцирующая оранжевого цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
РРК - раствор для разведения конъюгата. Прозрачная или слегка опалесцирующая жёлтого цвета жидкость; допустимо образование осадка, распадающегося при встряхивании.	1 флакон 13,5 мл
РРС - раствор для предварительного разведения сывороток. Прозрачная сине-фиолетового цвета жидкость.	1 флакон 12,5мл
РД - раствор, денатурирующий для определения индекса авидности антител. Прозрачная сиреневого цвета жидкость.	1 флакон 8, 0 мл
БР - блок-раствор для рабочего разведения сывороток. Прозрачная розового цвета жидкость, допустимо образование осадка, распадающегося при встряхивании.	1 флакон 12,5мл
РС - раствор сравнения для определения индекса авидности антител. Прозрачная зелено-голубого цвета жидкость.	1 флакон 8, 0 мл
ПР (концентрат x 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 предварительного разведения сывороток.

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 распыливания образцов или растворов. При распыливании немедленно дезактивировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.
- Не допускать контакта субстратного буфера, хромогена, стоп-реагента с кожей и слизистыми.
- После проведения ферментативной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в сточную трубу. 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 ± 0,5) °С.
- Автоматический анализатор для иммуноферментного анализа открытого типа.
- Устройство для промывания планшетов (вошер).
- Бумага фильтровальная лабораторная.
- Перчатки медицинские.
- Колба мерная.

VI. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Индекс avidности рекомендуется определять для сывороток, продемонстрировавших положительный результат на наличие антител класса IgG к вирусу краснухи. 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°C.

VII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

K₁+ - контрольный положительный высокоavidный образец.

K₂+ - контрольный положительный низкоavidный образец.

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

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

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

РС - раствор сравнения. Перед использованием тщательно перемешать.

РД - раствор денатурирующий. Перед использованием тщательно перемешать.

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 мес 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 (x 25) 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 конъюгата (x 21) (согласно табл. 1 и 2) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Хранение: рабочий раствор конъюгата стабилен не более 6ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

СС - субстратная смесь, готовить 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), K₁+, K₂+, РС, РД, РРК, БР, PPC, 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 мин при температуре от 18 до 24 °С.

Перед использованием иммуносорбент не промывать!

Объемы 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. х 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. х 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		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц. х 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. х 21) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
2	8,0	192,0	0,10	2,0	0,2	2,0
4	16,0	384,0	0,20	4,0	0,4	4,0
6	24,0	576,0	0,30	6,0	0,6	6,0
8	32,0	768,0	0,40	8,0	0,8	8,0
10	40,0	960,0	0,50	10,0	1,0	10,0
12	48,0	1152,0	0,65	13,0	1,2	12,0

1. Проведение ИФА при ручной постановке

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

1.2. Контрольные образцы внести по 100 мкл в лунки двух параллельных стрипов. Например, в лунки А-1 и А-2 внести по 100 мкл K_1+ , в лунки В-1 и В-2 - по 100 мкл K_2+ , в лунки С-1 и С-2 - по 100 мкл рабочего промывочного раствора (для контроля конъюгата). В остальные лунки планшета внести по 90 мкл БР и попарно в соседние лунки двух стрипов (нечетного и четного) внести по 10 мкл предварительно разведенных (1:10) образцов исследуемых сывороток (конечное разведение сывороток в лунках – 1:100).

Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием, планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в течение 1 ч при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

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 планшета после промывки.

1.4. В лунки нечетных стрипов внести многоканальной пипеткой переменного объема по 100 мкл раствора сравнения, в лунки четных стрипов – по 100 мкл раствора денатурирующего и выдержать в течение 10 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

1.5. Содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 4 раза рабочим ПР, как в п. 1.3.

1.6. 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 $(37,0 \pm 0,5)$ °С.

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

1.8. 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.

1.9. 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.

IX. РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Учет результатов проводить 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. Результаты анализа учитывать, если значения оптической плотности (ОП) в лунках с K_1+ (реакция с РС) - не ниже 1,000, среднее значение ОП в лунках с K_2+ (реакция с РС) - не ниже 0,450, а среднее значение ОП в лунках с контролем конъюгата не выше 0,150.

Индекс avidности (ИА) рассчитать по формуле:

$$\text{ИА (\%)} = \frac{\text{ОП}_{\text{РД}}}{\text{ОП}_{\text{РС}}} \times 100\%$$

где ОП_{РД} – ОП исследуемого образца, реакция с РД;

ОП_{РС} – ОП исследуемого образца, реакция с РС.

2. Критерии достоверности. Полученные результаты достоверны, если индекс avidности K_1+ не менее 50 %, а индекс avidности K_2+ не более 40 %.

3. Интерпретация результатов.

Индекс avidности больше 40 % - сыворотка содержит высокоавидные антитела, что свидетельствует о ранее перенесенном заболевании*; индекс avidности меньше 40% - сыворотка содержит низкоавидные антитела, что указывает на текущую или недавно перенесенную инфекцию.

*Индекс avidности для образцов с высокими значениями ОП (более 3,0) следует считать больше 40%.

X. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ.




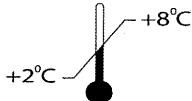



Срок годности – 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

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» Россия, 603093, 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