

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

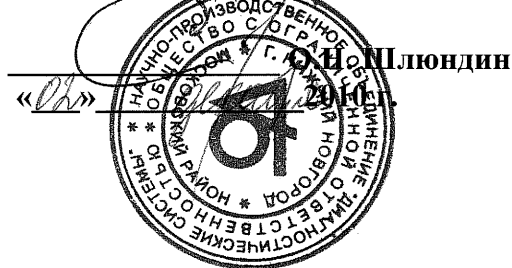
от \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

№ \_\_\_\_\_

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального директора

ООО «Научно-производственное  
объединение «Диагностические системы»



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«ДС-ИФА-анти-Rubella-M»

Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgM к

вирусу краснухи,

набор диагностический

## Содержание

I. Назначение.....	3
II. Общая информация.....	3
III. Принцип теста.....	3
IV. Состав набора .....	3
V. Меры предосторожности .....	4
VI. Инструкции по безопасности .....	5
VII. Необходимые материалы и оборудование, не предоставляемые с набором 6 реагентов .....	6
VIII. Отбор и подготовка образцов.....	6
IX. Подготовка реагентов.....	6
X. Проведение анализа.....	8
XI. Учет результатов.....	9
XII. Срок годности. Условия хранения и транспортирования .....	10
XIII. Объяснение символов.....	10

**Набор реагентов выпускается в одном комплекте.**

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

**I. НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор реагентов «ДС-ИФА-анти-Rubella-M» тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgM к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови человека.

**II. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

Краснуха широко распространенное острое инфекционное заболевание, характеризующееся мелкопятнистой экзантемой, генерализованной лимфаденопатией, умеренной интоксикацией и поражением плода у беременных.

После перенесенного заболевания формируется пожизненный иммунитет. Иммунологическим маркером первичной краснушной инфекции, протекающей как в манифестной, так и в инapparантной формах, является иммуноглобулин М к вирусу краснухи.

Среди серологических методов диагностики краснушной инфекции наиболее распространенным и доступным методом является метод иммуноферментного анализа (ИФА), для определения антител классов IgG и IgM. Наличие антител класса IgG в сыворотке в концентрации выше защитного уровня говорит о наличии иммунитета к краснушной инфекции. Определение IgM или низкоавидных IgG говорит о текущей или недавно перенесенной краснушной инфекции.

**III. ПРИНЦИП ТЕСТА**

Действующим началом тест-системы «ДС-ИФА-анти-Rubella-M» являются моноклональные антитела к IgM человека, сорбированные на планшетах и конъюгат, антиген вируса краснухи, конъюгированный с пероксидазой хрена. При наличии специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови, образуется комплекс антитело-специфический иммуноглобулин, который выявляется с помощью конъюгата, состоящего из антигенов вируса краснухи, меченых ферментом. Визуализация происходит в результате химической реакции пероксидазы с субстратной смесью с образованием цветной реакции, интенсивность которой зависит от количества связанного детектируемого вещества.

**IV. СОСТАВ НАБОРА**

Таблица 1

Реагент	Форма выпуска
Иммуносорбент – планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки), в лунках которого сорбированы моноклональные антитела к IgM человека.	1 планшет
Конъюгат – антиген вируса краснухи, конъюгированный с пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 13,5 мл

К+ (контрольный положительный образец), жидкий - сыворотка крови человека, содержащая антитела класса IgM к вирусу краснухи, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость.	1 флакон 1,2 мл
К- (контрольный отрицательный образец), жидкий - сыворотка крови человека, не содержащая антитела класса IgM к вирусу краснухи, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
РРС - раствор для предварительного разведения исследуемых сывороток. Прозрачная или слегка опалесцирующая сине-фиолетового цвета жидкость.	1 флакон 12,5 мл
БР - блок-раствор для рабочего разведения исследуемых сывороток. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость.	1 флакон 12,5 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 мл
СБ - субстратный буферный раствор. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 15 мл
ТМБ – хромоген – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 1,5 мл
Стоп-реагент – 0,2 М водный раствор серной кислоты прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25 мл

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами.

Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают инструкцию по применению.

Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка для ИФА планшетов	1 шт. 2 шт.
	Одноразовые наконечники	16 шт.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.
	Полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или пластиковая скрепка	1 шт.

## V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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 ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.

- Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной. Многоцветные ванночки для автоматических анализаторов необходимо сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной. Затем промыть 70 % раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной.
- Иммуносорбент допускается хранить в промежутках между отдельными операциями не более 10 мин (нельзя допускать высыхания лунок планшета).
- Ферментативная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстратов.
- Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.
- Промывка лунок - важный этап в данной процедуре: 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 растворов.
- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование.
- Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- Необходимо использовать воду высокого качества.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

## **VI. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ**

- Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении контрольного отрицательного образца (K-), не содержащие антитела класса IgM к вирусу краснухи, были протестированы и определены неактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1, гепатита С и антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении контрольного положительного образца (K+), содержащие антитела класса IgM к вирусу краснухи, были протестированы и определены неактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1, антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2.
- При работе с реагентами набора (K-, K+) и исследуемыми образцами нужно 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.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спец. одежду и одноразовые перчатки, тщательно мыть руки после работы с ними.
- Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезактивировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.
- Необходимо избегать контакта субстратного буфера, ТМБ, стоп-реагента с кожей и слизистыми.
- После проведения ферментной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализационную 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 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/см<sup>2</sup> (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/см<sup>2</sup> (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.



xi

- Некоторые реагенты содержат 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.

## **VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ**

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения с настройкой «по воздуху».
- Пипетки переменного объема (одно- и многоканальные).
- Наконечники одноразовые для пипеток переменного объема.
- Термостат (37,0 ± 0,5) °С.
- Устройство для промывания планшетов (вошер).
- Вода дистиллированная.
- Бумага фильтровальная лабораторная.
- Перчатки медицинские.

## **VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**

Сбор образцов крови должен проводиться в соответствии с текущей практикой. В качестве исследуемых образцов могут быть использованы сыворотка (плазма) крови человека. 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. Гемолиз может повлиять на рабочие характеристики теста. Исследование образцов с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией не допускается, т. к. может дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием.

## **IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

### **1. Реагенты готовые к применению:**

- **Конъюгат** – перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать и отобрать необходимое количество в чистую емкость.
- **К+** – контрольный положительный образец.
- **К-** – контрольный отрицательный образец.
- **PPC – 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.

- **Стоп-реагент.**

## 2. Реагенты, требующие предварительного приготовления.

**Иммуносорбент.** Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет и вынуть планшет. Взять необходимое количество стрипов. Неиспользованные стрипы без рамки поместить обратно в фольгированный пакет (не удаляя силикагель!) и тщательно герметизировать. Для этого поместить вскрытый пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или край фольгированного пакета свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета. После вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 6 мес. при температуре от 2 до 8 °С

**Все растворы необходимо отбирать пипетками переменного объема с одноразовыми наконечниками!**

**Рабочий промывочный раствор (ПР).** 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 таблицам 2 и 3). Полученный раствор тщательно перемешать. Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут. при температуре от 18 до 24 °С или 28 сут. при температуре от 2 до 8 °С.

**СС - субстратная смесь,** готовить перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (согласно таблицам 2 и 3), 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 или специальной емкости, предназначенной для постановки ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

**Субстратная смесь должна быть бесцветной!**

Объёмы реагентов для проведения анализа на необходимом количестве стрипов или на целом планшете приведены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

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

Рабочий промывочный раствор		СС	
ПР (конц x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
48,0	1152,0	1,2	12,0

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

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		СС	
	ПР (конц x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
1	4,0	96,0	0,1	1,0
2	8,0	192,0	0,2	2,0
3	12,0	288,0	0,3	3,0
4	16,0	384,0	0,4	4,0
5	20,0	480,0	0,5	5,0
6	24,0	576,0	0,6	6,0
7	28,0	672,0	0,7	7,0
8	32,0	768,0	0,8	8,0
9	36,0	864,0	0,9	9,0
10	40,0	960,0	1,0	10,0
11	44,0	1056,0	1,1	11,0
12	48,0	1152,0	1,2	12,0

**Хранение неиспользованных реагентов.**

После вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными реагенты набора (ПР (концентрат x 25), конъюгат, К-, К+, РРС, БР, СБ, ТМБ, стоп-реагент) хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С, иммуносорбент после вскрытия пакета - в течение 6 мес при температуре от 2 до 8 °С при условии, что пакет герметично закрыт с помощью скрепки (силикагель удалять из пакета нельзя!).

**Х. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

**Примечание:** Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при температуре от 18 до 24 °С.

**Проведение ИФА при ручной постановке.**

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 6 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

**Перед использованием иммуносорбент не промывать!**

2. 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.

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

- 1 стрип – 1 лунка К+, 1 лунка К-;
- 2 стрипа – 1 лунка К+, 2 лунки К-;
- 3 стрипа и более – 2 лунки К+, 2 лунки К-.

Например, при постановке ИФА на двух стрипах: в лунку стрипа А-1 дозатором пипеточным внести по 100 мкл К+, в 2 лунки В-1 и С-1 – по 100 мкл К-.

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



Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием, планшет закрыть крышкой или защитной плёнкой и выдержать в термостате в течение 30 мин при температуре  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ .

4. 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.

5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате в течение 60 мин при температуре  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ .

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

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

8. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и, спустя 3-4 мин, провести учет результатов.

### **Проведение ИФА в автоматическом режиме**

Проведение ИФА в автоматическом режиме на автоматическом анализаторе типа «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN», Австрия (возможна постановка на других моделях ИФА-анализаторах открытого типа).

1. Задать программу проведения ИФА и включить анализатор.

2. Приготовленный рабочий промывочный раствор залить в предназначенную для него емкость, остальные рабочие растворы и реагенты поместить в специальные контейнеры, контрольные образцы К+ и К-, образцы исследуемых сывороток в объеме не менее 300 мкл – во флаконы, которые установить в соответствующие штативы анализатора; поместить в анализатор необходимое количество планшетов с иммуносорбентом.

3. По окончании анализа (общее время 2 ч) прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов К+ и К-.

4. Реакцию следует учитывать, если значения оптической плотности (ОП) в лунках с К+ не менее 0,6 а среднее значение ОП К- не более 0,2. Далее учет результатов проводить согласно п. XII.

## **XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ**

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 значение оптической плотности (ОП) в лунках с К+ – не менее 0,6, среднее значение ОП К- – не более 0,2.

ОП<sub>крит.</sub> рассчитывать по формуле:

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

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

Положительным считать образец со значением ОП, превышающим значение  $1,1 \times \text{ОП}_{\text{крит.}}$ .

Отрицательным считать образец со значением ОП менее значения  $0,9 \times \text{ОП}_{\text{крит.}}$ .

Сомнительным считать образец с ОП в интервале:  $0,9 \times \text{ОП}_{\text{крит.}} \leq \text{ОП} \leq 1,1 \times \text{ОП}_{\text{крит.}}$ .  
Рекомендуется повторить анализ такого образца.

## ХII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ




Срок годности – 15 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 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.

## ХIII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

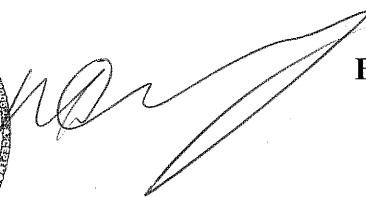
	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/СЕ по in vitro диагностическим МУ)
	Только для лабораторного использования
	Код партии (номер серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Используйте инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

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




В. К. Пименов

«СОГЛАСОВАНО»  
Зав.кафедрой клинической  
лабораторной диагностики  
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»  
д.м.н, профессор



В.В. Долгов

Подпись   
удостоверяю: специалист  
кадровой работы ГОУ ДПО  
РМАПО Росздрава  
подпись 