

УТВЕРЖДЕНА

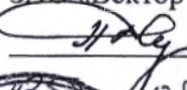
Приказом Росздравнадзора

от 21.09 2012 г. № 1536-П/12

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
антигена ротавируса человека
(Ротавирус-антиген-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Ротавирус-антиген – ИФА – Бест» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления антигена ротавируса человека методом твердофазного иммуноферментного анализа в вируссодержащих культуральных жидкостях при лабораторных исследованиях, в экстрактах фекалий при клинических исследованиях, в образцах питьевой и сточной воды, воды открытых водоемов.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 определений, включая контроли, или 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител к группоспецифическому антигену ротавирусов человека и конъюгата поликлональных антител к ротавирусам с пероксидазой хрена.

Принцип метода заключается во взаимодействии антигена ротавируса с моноклональными антителами, иммобилизованными в лунках полистиролового планшета. Комплекс «антиген–антитело» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата.

Количество связавшегося конъюгата выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена ротавируса в анализируемых образцах.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором НИИСД
М.П. Гришаевым и с.н.с. Н.И. Ливичкой

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к группоспецифическому антигену ротавирусов группы А человека – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), буферный раствор, содержащий инактивированный антиген ротавируса человека, – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец (K^-), буферный раствор, не содержащий антиген ротавируса человека; – 1 фл., 2,5 мл;
- конъюгат поликлональных антител к ротавирусам с пероксидазой хрена – 1 фл., 13 мл;
- раствор для образцов (РО), концентрат – 1 фл., 20 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл;

Дополнительно набор комплектуется:

- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки на 4-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфическая активность.

Набор должен выявлять антиген ротавируса в реакции иммуноферментного анализа в СОП+ (рег. № 05-2-209) и положительном контрольном образце (K^+); и не выявлять в отрицательном контрольном образце (K^-).

Титр антигена ротавируса в СОП+ должен быть не менее 1:128 при 2-стадийной инкубации и не менее 1:32 при 1-стадийной инкубации.

При этом среднее значение оптической плотности отрицательного контрольного образца ($ОП_{ср}K^-$) не должно превышать 0,2; положительного контрольного образца ($ОП_{ср}K^+$) должно быть не ниже 0,7.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113-00 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» от 30.12.1998 г).

4.4. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.5. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

4.6. При подготовке к проведению анализа следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113-00.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (*четвертичных аммониевых соединений*), спиртов, третичных аминов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм;
- термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °C;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 до 350 мкл;
- промыватель для планшетов автоматический или ручной;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

- пробирки вместимостью 1,5 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы фекалий человека.

Для выявления антигена ротавируса в фекалиях предварительно приготовить экстракт 20 %-ной суспензии фекалий на рабочем растворе для образцов (см. п. 7.1.5.). Образцы фекалий собрать в стерильные флаконы (пробирки) с пробкой вместимостью 10 мл. Фекалии в количестве 1 г (¼ флакона) встряхнуть с 5,0 мл рабочего раствора для образцов до получения гомогенной взвеси, центрифугировать при 3000 об/мин в течение 30 мин. С помощью пипетки осторожно отбирают надосадочную жидкость в чистую пробирку. Исследуют полученную надосадочную жидкость.

Для выявления АГ ротавируса использовать как свежеприготовленный образец, так и хранившейся при температуре от 2 до 8 °С в течение 24 часов, либо замороженный при минус 20°С в течение 3 месяцев.

6.2. Образцы воды.

Взятие и подготовку проб воды (водопроводной, из открытых источников или иной) необходимо проводить в соответствии с МУК 4.2.2029-05 «Санитарно-вирусологический контроль водных объектов», утвержденными Главным государственным санитарным врачом РФ 18.11.2005 г. К обработке и исследованию проб воды необходимо приступать сразу же после доставки проб в лабораторию.

Для выявления антигена ротавируса в воде необходимо провести предварительное концентрирование вируса, с использованием известных методов, рекомендованных МУК 4.2.2029-05.

Мелкодисперсные сорбенты (такие как гидроокись алюминия), использованные для концентрирования вируса, и оставшиеся в пробах, необходимо удалить, например, высокоскоростным центрифугированием.

Перед постановкой в ИФА элюат нельзя подвергать обработке хлороформом, дезинфицирующими средствами, бактериостатиками. Для удаления бактериальной микрофлоры рекомендуется использовать только фильтрацию через стерилизующие мембраны.

После элюции образцов с сорбента или трековой мембраны рН образцов необходимо довести до значения 7,2–7,4.

Полученные пробы допускается хранить до анализа не более 24 ч при температуре от 2 до 8 °С или до 3 мес при температуре минус 20 °С и ниже. При необходимости многократного исследования, пробы следует разделить на несколько порций, чтобы избежать повторного замораживания.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка к анализу.

7.1.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °С не менее 60 мин.

7.1.2. Подготовка планшета.

Непосредственно перед использованием вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов; остальные стрипы снять с рамки и немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы после первого вскрытия пакета можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.1.3. Положительный и отрицательный контрольные образцы (K^+ и K^-) даны в рабочем разведении и не требуют дополнительного разведения.

После вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора. Перед использованием содержимое флакона встряхнуть.

7.1.4. Приготовление промывочного раствора.

Необходимое для проведения анализа, в зависимости от числа используемых стрипов, количество 25-кратного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином развести дистиллированной водой в 25 раз (см. таблицу). При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный рабочий фосфатно-солевой буферный раствор с твином можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.1.5. Приготовление рабочего раствора для разведения образцов.

Содержимое флакона с концентратом раствора для образцов добавить к 480 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать.

В случае дробного использования набора отобрать из флакона необходимое количество концентрата раствора для образцов, развести дистиллированной водой в соотношении 1:24 (1 часть концентрата на 24 части дистиллированной воды).

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный рабочий раствор для разведения образцов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.1.6. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

После вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора. Перед использованием содержимое флакона встряхнуть.

Таблица расхода реагентов

Кол-во используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т×25, мл	Дистил. вода, мл
1	1,0	1,0	2,0	до 50
2	2,0	2,0	4,0	до 100
3	3,0	3,0	6,0	до 150
4	4,0	4,0	8,0	до 200
5	5,0	5,0	10,0	до 250
6	6,0	6,0	12,0	до 300
7	7,0	7,0	14,0	до 350
8	8,0	8,0	16,0	до 400
9	9,0	9,0	18,0	до 450
10	10,0	10,0	20,0	до 500
11	11,0	11,0	22,0	до 550
12	12,0	12,0	24,0	до 600

7.1.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор тетраметилбензидина готов к использованию. Необходимо исключить воздействие света на раствор тетраметилбензидина.

После вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора. Перед использованием содержимое флакона встряхнуть.

7.1.8. Стоп-реагент готов к использованию. После вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.2. Проведение анализа для определения антигена ротавируса в экстрактах фекалий.

7.2.1. Внесение контрольных (К+ и К-) и исследуемых образцов.

Внесение контрольных и исследуемых образцов в лунки планшета должно занимать не более 5-7 мин, иначе время инкубации различных образцов с иммуносорбентом будет значительно отличаться, что приведет к неправильным результатам анализа.

В лунки стрипа, например А-1 и В-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K⁻). В лунку С-1 внести по 100 мкл положительного контрольного образца (K⁺).

В остальные лунки внести по 100 мкл подготовленных исследуемых образцов.

7.2.2. Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата (см п. 7.1.6). Планшет заклеить плёнкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37±1 °С.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.2.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (см п. 7.1.4), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

Внимание! Промывку при помощи автоматического промывателя рекомендуется проводить в режиме с переполнением («Overflow») с 5-ю циклами промывки и внесением в лунки по 600–700 мкл рабочего промывочного раствора. При этом следует использовать поперечную аспирацию раствора из лунок (режим «Crosswise»), чтобы остаточный объем не превышал 10 мкл.

7.2.4. Во все лунки внести по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см п. 7.1.7). Планшет поместить в защищённое от света место и выдержать в течение 25 мин при температуре (18-25) °С.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.2.5. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

7.3. Проведение анализа для определения антигена ротавируса в образцах воды, культуральной жидкости.

7.3.1. Внесение контрольных образцов (K⁺ и K⁻) и исследуемых образцов.

Внесение контрольных и исследуемых образцов в лунки планшета должно занимать не более 5-7 мин, иначе время инкубации различных образцов с иммуносорбентом будет значительно отличаться, что приведет к неправильным результатам анализа.

В лунки стрипа, например А-1 и В-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K⁻). В лунку С-1 внести по 100 мкл положительного контрольного образца (K⁺).

В остальные лунки внести по 100 мкл подготовленных исследуемых образцов.

7.3.2. Планшет заклеить плёнкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре 37±1 °С.

7.3.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (см п. 7.1.4), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

Внимание! Промывку при помощи автоматического промывателя рекомендуется проводить в режиме с переполнением («Overflow») с 5-ю циклами промывки и внесением в лунки по 600–700 мкл рабочего промывочного раствора. При этом следует использовать поперечную аспирацию раствора из лунок (режим «Crosswise»), чтобы остаточный объем не превышал 10 мкл.

По окончании промывания из лунок тщательно удалить остатки влаги, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

7.3.4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата (см п. 7.1.6). Планшет заклеить плёнкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре 37 ± 1 °C.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.3.5. По окончании второй инкубации планшет промыть, как описано в п. 7.3.3.

7.3.6. Во все лунки внести по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см п. 7.1.7). Планшет поместить в защищённое от света место и выдержать в течение 25 мин при температуре (18–25) °C.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.3.7. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–650 нм; или при длине волны 450 нм. Измерение проводить не позднее 5 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать средние значения оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным и положительным контрольными образцами ($ОП_{cpK^-}$, $ОП_{cpK^+}$).

Результаты исследований учитывают только при соблюдении следующих условий:

– среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{cpK^-}$) не

более 0,20;

– среднее значение ОП в лунках с положительным контрольным образцом (ОП_{кр} К⁺) не менее 0,70.

9.2. Для оценки результатов анализа вычислить критическое значение оптической плотности (ОП_{кр}) по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{кр}} = \text{ОП}_{\text{кр}} (\text{К}^-) + 0,2,$$

где: ОП_{кр} (К⁻) – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.3. Результат анализа считают положительным, если значение оптической плотности в лунке с исследуемым образцом равно или превышает ОП_{кр} (ОП_{обр} ≥ ОП_{кр}).

9.4. Результат анализа считают отрицательным, если значение оптической плотности в лунке с исследуемым образцом ниже ОП_{кр} (ОП_{обр} < ОП_{кр}).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности набора.

В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– положительный и отрицательный контрольные образцы, конъюгат, 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, концентрат раствора для образцов, раствор тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– промывочный раствор и рабочий раствор для образцов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

10.4. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином, стоп-реагента), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

10.5. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора «Ротавирус-антиген-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 363-20-60, тел./факс (383) 363-13-46, 363-35-55.

E-mail: ybobtk@vector-best.ru

в.н.с. НИИСД
ЗАО «Вектор-Бест»

Лич.

Н.И. Ливицкая

Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

СД

М.П. Гришасв

«СОГЛАСОВАНО»
зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России



Н., профессор В.В. Долгов

одним из	20
удостоверено:	
Специалист по кадрам РМАПО	
Подпись _____	
_____ 20 ____ года	

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 70 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"

" 01 " _____ 2017 г. Масыго А.В.

