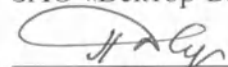


УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

от _____ 2012 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

«Вектор-Бест» 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
антигена аденовируса человека

(Аденовирус-антиген-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Аденовирус-антиген-ИФА-БЕСТ (далее по тексту – набор) предназначен для выявления антигена аденовируса человека методом твердофазного иммуноферментного анализа в фекалиях больных острыми гастроэнтеритами и контактных лиц.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

Специфическими компонентами набора являются моноклональные антитела к антигенам аденовируса человека, иммобилизованные в лунках планшета; конъюгат моноклональных антител к аденовирусу с пероксидазой хрена и контрольный положительный образец.

Принцип метода заключается во взаимодействии антигена аденовируса 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.

*Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД
М.Ю. Рукавишниковым и в.н.с. Н.И. Ливицкой*

Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена аденовируса в анализируемом образце.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения $ОП_{крит}$ анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицательные.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными моноклональными антителами к антигену аденовируса человека, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) – буферный раствор, содержащий инактивированный антиген аденовируса человека, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) – буферный раствор, не содержащий антиген аденовируса человека, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат, концентрат – моноклональные антитела к аденовирусу, меченные пероксидазой хрена – 1 флакон (1,5 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);
- раствор для образцов (РО), концентрат – 1 флакон (20 мл);
- раствор для разведения конъюгата (РРК) – 1 флакон (13 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 5-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфическая активность.

Набор должен выявлять антиген аденовируса в реакции иммуноферментного анализа в СОП+ (рег. № 05-2-361) и положительном контрольном образце (K^+); и не выявлять в отрицательном контрольном образце (K^-).

Титр антигена аденовируса в СОП+ должен быть не менее 1:32.

Среднее значение оптической плотности отрицательного контрольного образца

(ОП_{срК⁻}) не должно превышать 0,2; положительного контрольного образца (ОП_{срК⁺}) должно быть не ниже 1,0.

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 клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» от 30.12.1998 г).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших 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, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H₂O₂, деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

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 объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл (погрешность не более 5 %);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 до 350 мкл (погрешность не более 5 %);
- 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;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы фекалий человека

Для выявления антигена аденовируса в фекалиях предварительно приготовить экстракт 20 %-ной суспензии фекалий на рабочем растворе для образцов (см. п. 7.5.). Образцы фекалий собрать в стерильные флаконы (пробирки) с пробкой вместимостью 10 мл. Фекалии в количестве 1 г ($\frac{1}{4}$ флакона) встряхнуть с 5,0 мл рабочего раствора для образцов до получения гомогенной взвеси, центрифугировать при 3000 об/мин в течение 30 мин. Исследуют надосадочную жидкость. Для выявления АГ аденовируса можно использовать как свежеприготовленные образцы, так и хранившиеся при температуре от 2 до 8 °C в течение 24 часов, либо замороженный при минус 20°C в течение не более 3 месяцев.

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

7.2. 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.

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

7.4. Приготовление промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

7.5. Приготовление рабочего раствора для 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 и 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.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в чистый флакон, используя чистые наконечники, внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата и соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25 °С в течение 3 ч после приготовления.

Таблица расхода реагентов

Количество одновремен- но исполь- зуемых стри- пов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Промывочный раствор	
	Конъюгат, концен- трат, мл	Раствор для разве- дения конъюгата, мл	Концен- трат тет- раметил- бензидина, мкл	Субстрат- ный бу- ферный раствор, мл	Фосфатно- солевой бу- ферный рас- твор с тви- ном, кон- центрат (×25) мл	Дистилли- рованная вода, мл
1	0,1	1,0	50	1,0	2,0	48
2	0,2	2,0	100	2,0	4,0	96
3	0,3	3,0	150	3,0	6,0	144
4	0,4	4,0	200	4,0	8,0	192
5	0,5	5,0	250	5,0	10,0	240
6	0,6	6,0	300	6,0	12,0	288
7	0,7	7,0	350	7,0	14,0	336
8	0,8	8,0	400	8,0	16,0	384
9	0,9	9,0	450	9,0	18,0	432
10	1,0	10,0	500	10,0	20,0	480
11	1,1	11,0	550	11,0	22,0	528
12	1,2	12,0	600	12,0	24,0	576

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

В соответствии с числом используемых стрипов (см таблицу) в чистый флакон внести необходимое количество субстратного буферного раствора и добавить соответствующее количество концентрата тетраметилбензидина, тщательно перемешать. Приготовленный раствор должен быть прозрачным и бесцветным.

Рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить при комнатной температуре в течение 3 ч после приготовления в защищенном от света месте.

7.8. В лунки стрипа, например А-1 и В-1 и С-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-). В лунки D-1, E-1 внести по 100 мкл положительного контрольного образца (K^+).

В остальные лунки внести по 100 мкл подготовленных исследуемых образцов.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех стрипов планшета.

7.9. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 7.6).

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

7.10. Планшет заклеить плёнкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 ± 1 °С.

7.11. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить её в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.4.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку внести 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 промывочного раствора.

7.12. Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.7). Планшет поместить в защищённое от света место и выдержать в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

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

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620 - 655 нм. Допускается измерение оптической плотности при длине волны 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

Результаты исследований учитывают только при соблюдении следующих условий:

– среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср} K^-$) не более 0,20;

– среднее значение ОП в лунках с положительным контрольным образцом ($ОП_{ср} K^+$) не менее 1,0.

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

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} (K^-) + 0,2,$$

где: $ОП_{ср} (K^-)$ – 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 $ОП_{крит}$ ($ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$).

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Набор реагентов Аденовирус-антиген-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °C не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

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

В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности;
- положительный и отрицательный контрольные образцы можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для образцов и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности;
- концентрат конъюгата, концентрат тетраметилбензидина, раствор для разведения конъюгата после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности;
- рабочий раствор конъюгата и рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить при температуре от 18 до 25 °C не более 3 часов;
- промывочный раствор и рабочий раствор для образцов можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 суток.

10.3. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, СРБ), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

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

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 336-73-46, 363-57-95, тел./факс (383) 336-60-30.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Ведущий научный сотрудник НИИСД
ЗАО «Вектор-Бест»

Н.И. Ливицкая

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»

зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России



д.м.н., профессор В.В. Долгов

«05» 07 2018г.

Подпись _____
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____
" " 20__ года