

12 - 0504375804

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации

Г.Г. Онищенко

« 27 » 10 2005 г

№

01/11/123-05

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

тест-системы иммуноферментной

для выявления дифтерийных и столбнячных антител,

набор диагностический

Тест-система иммуноферментная для выявления дифтерийных и столбнячных анти-
представляет собой набор реагентов для проведения иммуноферментного анализа
на твердофазном носителе:

ИММУНОСОРБЕНТ – 96-луночный полистироловый или хлорвиниловый планшет
для иммунологических реакций, в лунках которого сорбирован анатоксин дифтерий-
ный очищенный;

ИММУНОСОРБЕНТ – 96-луночный полистироловый или хлорвиниловый планшет
для иммунологических реакций, в лунках которого сорбирован анатоксин столбняч-
ный очищенный;

КОНЬЮГАТ («Конферм - G[®]») - иммуноглобулины (F(ab')₂-фрагменты) диагностиче-
ские против IgG человека, аффинноочищенные, меченные пероксидазой, прозрачная
вязкая жидкость бледно-желтого цвета или бесцветная;

К⁺ - контрольный положительный образец - сыворотка или плазма крови человека с
известным титром дифтерийных и столбнячных антител (титр сыворотки указан на
этикетке флакона), инактивированная, таблетка или аморфная масса бледно-розового
или кремового цвета, лиофильно высушенная из объема 0,2 мл;

К⁻ - контрольный отрицательный образец - сыворотка или плазма крови человека, не
содержащая дифтерийных и столбнячных антител, инактивированная, таблетка или
аморфная масса бледно-розового или кремового цвета, лиофильно высушенная из
объема 0,2 мл;

ОФД – орто-фенилендиамин – таблетки белого или кремового цвета, гигроскопичны;

ОСБ-Т - концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, прозрачная
или слегка опалесцирующая пенящаяся жидкость. При отстаивании возможно выпав-
ление кристаллического осадка солей, растворяющегося при температуре (37 ± 1) °C
течение 30 мин;

ЛОКАТОР (Б) - белково-солевой раствор – таблетка или аморфная масса белого цве-
та, лиофильно высушенная из объема 5,0 мл;

ФБРП - цитратно-фосфатный буферный раствор с перекисью водорода, прозрачная
бесцветная жидкость;

С – стоп-реагент – 5 % раствор серной кислоты, прозрачная бесцветная жидкость.

Набор рассчитан на исследования 58 образцов сыворотки крови (плазмы) человека на
дифтерийных или столбнячных антител.

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА. Тест – система выявляет дифтерийные и
столбнячные антитела в сыворотке (плазме) крови человека с чувствительностью не менее
1:100 при помощи иммуноферментного анализа с использованием антивидового конь-

иммуноглобулины (F(ab')₂-фрагменты) диагностические против IgG человека, аффинные, меченные пероксидазой).

НАЗНАЧЕНИЕ. Для определения уровня дифтерийных и столбнячных антител с целью контроля эффективности иммунизации и выявления групп повышенного риска.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ.

Подготовка исследуемых образцов

Отобранные образцы сыворотки (плазмы) крови человека хранят при температуре 4°C не более 24 ч. Более длительное хранение допускается при температуре не выше 20°C .

Образцы с выраженным гемолизом и опалесцирующие, а также проросшие или подвергшиеся многократному замораживанию и оттаиванию анализу не подлежат.

Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо центрифугированием.

Все используемые компоненты набора необходимо выдерживать не менее 30 мин при температуре $(20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$.

Подготовка растворов и реагентов. Приготовление растворов рассчитано для реакции на одном планшете.

Приготовление ФСБ-Т. Содержимое одного флакона концентрата ФСБ – Т (26 мл) переносят в мерный цилиндр и доводят объем раствора до 650 мл дистиллированной водой. Полученный раствор должен иметь pH $(7,2 \pm 0,2)$. При наличии во флаконе с ФСБ-Т визуально определяемого осадка солей, флаконы с концентратом подогревают при температуре $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ до полного растворения осадка. Приготовленный раствор ФСБ-Т допускается хранить при температуре $2-10^{\circ}\text{C}$ до 48 ч.

Приготовление раствора ФСБ-Т-Б. Содержимое одного флакона с блокатором растворяют в 5,0 мл дистиллированной воды, полученный раствор добавляют в полный объем ФСБ-Т. Приготовленный раствор ФСБ – Т – Б допускается хранить не более 24 ч при комнатной температуре.

Подготовка контрольных образцов и исследуемых сывороток. K^{+} - содержимое флакона растворяют в 0,2 мл дистиллированной воды. Раствор может храниться при температуре от 4 до 6°C не более одной недели. Для анализа разводят K^{+} до 1:200 (к 0,2 мл исходного раствора добавляют 39,8 мл ФСБ-Т-Б). Далее делают двукратные разведения в ФСБ-Т-Б (1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200). K^{-} - содержимое флакона растворяют в 0,2 мл дистиллированной воды. Раствор может храниться при температуре от 4 до 6°C не более одной недели. Для анализа используют рабочее разведение K^{-} 1:20 (к 0,2 мл исходного раствора добавляют 3,8 мл ФСБ-Т-Б). Исследуемые сыворотки разводят ФСБ-Т-Б 1:20, 1:200, 1:2000.

Приготовление рабочего разведения конъюгата. Из флакона отбирают необходимый объем конъюгата и разводят его в ФСБ – Т – Б до указанного на этикетке рабочего разведения. Учитывая то, что рабочее разведение конъюгата имеет высокое значение, делают промежуточное разведение концентрата конъюгата 1:100. Раствор хранению не подлежит.

Приготовление рабочего раствора субстрата. Раствор ОФД готовят непосредственно перед использованием. Пять таблеток, содержащих по 2 мг ОФД, растворяют в 21,5 мл ЦФБРП или две таблетки, содержащие по 6 мг ОФД в 26 мл ЦФБРП. Раствор тщательно перемешивают до полного растворения таблеток. Раствор готовят в защищенном от света месте. Раствор хранению не подлежит.

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА.

Промывание планшетов. Планшет с иммобилизованным дифтерийным (столбнячным) анатоксином промывают 3 раза раствором ФСБ – Т – Б, внося в каждую лунку планшета по 300 мкл раствора. По окончании промывки из лунок планшета тщательно

но удаляют влагу, постукивая по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге;

Внесение контрольных и исследуемых образцов. В лунки планшета вносят по 100 мкл разведений K^+ (A1 – 1:200, B1 – 1:400, C1 – 1:800, D1 – 1:1600, E1 – 1:3200), рабочего разведения K^- (F1, G1 – 1:20), исследуемых сывороток (A2 – H12) в разведениях 1:20, 1:200, 1:2000. Для контроля конъюгата в лунку H1 добавляют 100 мкл раствора ФСБ -Т- Б. Планшет герметично закрывают и инкубируют (60 ± 5) мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ C$;

По окончании инкубации планшет промывают 5 раз и высушивают (п.1);

Внесение раствора конъюгата. В каждую лунку планшета, кроме H1, вносят по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении. В лунку H1 вносят 100 мкл раствора ФСБ - Т - Б. Планшет герметично закрывают и инкубируют в течение (60 ± 5) мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ C$;

По окончании инкубации планшет промывают 5 раз и высушивают (п.1);

Внесение раствора субстрата. Вносят в каждую лунку планшета по 200 мкл раствора субстрата. Планшет выдерживают при температуре $(20 \pm 2)^\circ C$ в течение 20 мин в защищенном от света месте;

Внесение стоп-реагента. Реакцию останавливают внесением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента.

РЕГИСТРАЦИЯ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ. Результаты ИФА регистрируют на спектрометре при длине волны 492 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по лунке планшета H1. Среднее значение ОП субстратного раствора в лунках с K^- (разведение 1:20) не должно превышать 0,1. Значение ОП субстратного раствора в лунке K^+ в разведении 1:200 должно превосходить средний показатель ОП в лунках с K^- (разведение 1:20) не менее чем 3 раз.

Исследуемые сыворотки, ОП которых в разведении 1:20 меньше или равна ОП разведения K^- , не содержат специфических антител в защитном титре.

Определение уровня специфических антител в положительных образцах сывороток проводят по градуировочному графику, построенному в координатах: $y - \lg \text{ОП } K^+$, $x - \log_2$ степени его разведения (см. график). График строят по результатам измерения ОП для разведений K^+ .

Зная ОП исследуемого образца (например, 0,347 – в разведении 1:200), находят $\lg$ этого числа ($\lg 0,347 = -0,46$) и через точку на оси ординат, соответствующую его значению (-0,46), проводят прямую, параллельную оси абсцисс. Через точку пересечения прямой и линейного участка графика опускают перпендикуляр на ось абсцисс и определяют $\log_2$ степени разведения положительного контрольного образца ($X=2,8$), соответствующий значению ОП данного разведения исследуемого образца.

Затем по таблице 2 находят кратность разведения контрольного положительного образца, соответствующую этому логарифму ($A=6,96$).

После этого проводят расчет титра антител в исследуемом образце по формуле:

$$T_1 \times B \div (A \times 100), \text{ где } T_1 - \text{титр исследуемого образца, МЕ/мл; } T_1 - \text{титр положительного контрольного образца (указан на этикетке); } A - \text{кратность разведения положительного контрольного образца, найденная по таблице 2; } A \times 100 - \text{разведение положительного контрольного образца; } B - \text{разведение исследуемой сыворотки, в котором определялась оптическая плотность.}$$

Пример расчета: Если титр положительного контрольного образца равен 2 МЕ/мл дифтерийных антител, то титр исследуемой сыворотки в нашем примере (таблица 1):

$$\frac{2 \times 200}{6,96 \times 100} = 0,57 \text{ МЕ/мл дифтерийных антител}$$

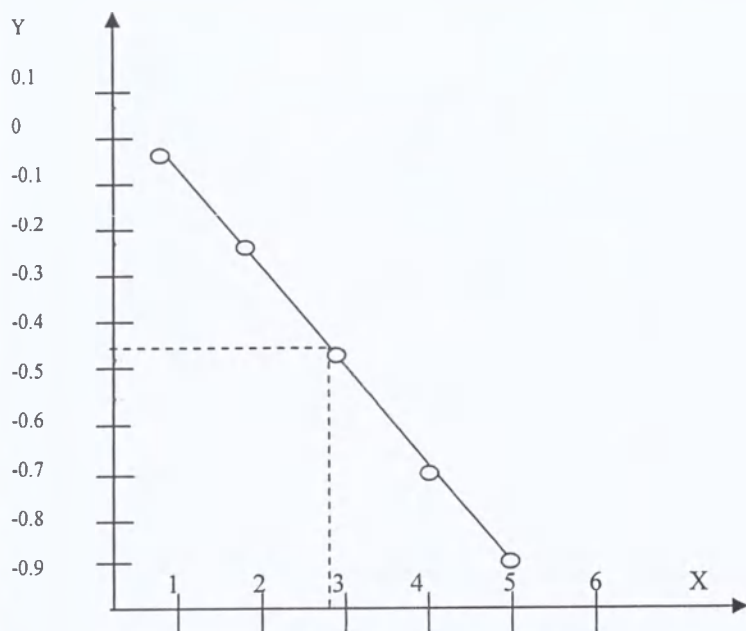


Таблица 1

Пример расчета уровня антител

Исходный контрольный образец (K ⁺)				Исследуемые сыворотки					
Позиция K ⁺	X	ОП	Y	разведение сыворотки	ОП	X	Y	A	Титр МЕ/мл
	1	0,954	-0,02	1:200	0,347	2,8	-0,46	6,96	0,57
	2	0,565	-0,25						
	3	0,340	-0,47						
	4	0,201	-0,70						
	5	0,149	-0,83						

Таблица 2

Логарифм кратности разведения, найденный по графику (X)	Кратность разведения (A)	Логарифм кратности разведения, найденный по графику (X)	Кратность разведения (A)	Логарифм кратности разведения, найденный по графику (X)	Кратность разведения (A)
0,1	1,07	3,4	10,56	6,7	103,97
0,2	1,15	3,5	11,31	6,8	111,43
0,3	1,23	3,6	12,13	6,9	119,43
0,4	1,32	3,7	13,00	7,0	128,00
0,5	1,41	3,8	13,93	7,1	137,19
0,6	1,52	3,9	14,93	7,2	147,03
0,7	1,62	4,0	16,02	7,3	157,58
0,8	1,74	4,1	17,15	7,4	169,90
0,9	1,87	4,2	18,38	7,5	181,02
1,0	2,00	4,3	19,70	7,6	194,01
1,1	2,14	4,4	21,11	7,7	207,94
1,2	2,29	4,5	22,63	7,8	222,86
1,3	2,46	4,6	24,95	7,9	238,85
1,4	2,63	4,7	26,00	8,0	256,00
1,5	2,83	4,8	27,06	8,2	274,37
1,6	3,03	4,9	29,88	8,3	294,07
1,7	3,25	5,0	32,00	8,4	315,17
1,8	3,48	5,1	34,30	8,5	337,80
1,9	3,73	5,2	36,76	8,6	362,04
2,0	4,00	5,3	39,40	8,7	388,02
2,1	4,29	5,4	42,22	8,8	415,87
2,2	4,59	5,5	45,25	8,9	445,72
2,3	4,92	5,6	48,50	9,0	477,71
2,4	5,28	5,7	51,98	9,1	512,00
2,5	5,66	5,8	55,72	9,2	548,75
2,6	6,06	5,9	59,71	9,3	588,13
2,7	6,50	6,0	64,00	9,4	630,35
2,8	6,96	6,1	68,59	9,5	675,59
2,9	7,46	6,2	73,52	9,6	724,08
3,0	8,00	6,3	78,79	9,7	776,05
3,1	8,57	6,4	84,45	9,8	831,75
3,2	9,19	6,5	90,51	9,9	891,44
3,3	9,85	6,6	97,01	10,0	1023,00

ФОРМА ВЫПУСКА. Тест-система выпускается в виде набора:

ИММУНОСОРБЕНТ – планшет с иммобилизованным
бактерийным анатоксином.

- 1 шт;

ИММУНОСОРБЕНТ – планшет с иммобилизованным
клеточным анатоксином.

- 1 шт;

КОНЬЮГАТ («Конферм - G®»)

- 2 флакона по 0,05 мл;

К⁺ - контрольный положительный образец - лиофильно
сушен из объема 0,2 мл

- 2 флакона;

К⁻ - контрольный отрицательный образец - лиофильно вы-
сушен из объема 0,2 мл

- 2 флакона;

ОФД – орто-фенилендиамин

- 2 флакона (2 таб по 6
мг или 5 таб по 2 мг во
флаконе);

ФСБ-Т - концентрат фосфатно-солевого буферного рас-
твора с твином

- 2 флакона по 26 мл;

БЛОКАТОР (Б) белково-солевой раствор – лиофильно
сушен из объема 5,0 мл

- 2 флакона;

ЦФБРП - цитратно-фосфатный буферный раствор с пере-
месью водорода

- 2 флакона по 26 мл
(или по 21,5мл);

СР – стоп-реагент

- 2 флакона по 10 мл;

Инструкция по применению

УСЛОВИЯ ОТПУСКА. Для лечебно-профилактических и санитарно-
профилактических учреждений.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ. Срок годности – 6
лет. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит. Хранят в соответст-
вии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С в недоступном для детей месте. Транс-
портируют в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С.

Рекламации на качество направлять в Федеральное государственное учреждение нау-
ко-исследовательский институт стандартизации и контроля ме-
дицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича» Федеральной службы по над-
зору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (119002, Москва, Сивцев
век, 41 тел. (095) 241-39-22, факс (095) 241-92-38) и адрес предприятия-изготовителя
ОУП «НПО «Микроген», 115088, г. Москва, ул. 1-я Дубровская, д. 15, тел. (095) 981-62-00
адрес производства: 614089, г. Пермь, ул. Братская, д. 177, тел. (3422) 48-57-22).

Директор Департамента государственной
регистрации, лицензирования и контроля
качества лекарственных средств
ОУП «НПО «Микроген»



С.А. Коровкин

прошито, пронумеровано и
скреплено печатью
5 листа(ов)

