

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 201__ г.
№ _____

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального директора
ООО «Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»



О.Н.Шлюндин
2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-М»

Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgM
к вирусу клещевого энцефалита,
набор диагностический

Разработана впервые

Содержание

I. Назначение.....	3
II. Состав набора	3
III. Аналитические и диагностические характеристики набора...	4
IV. Меры предосторожности.....	4
V. Инструкции по безопасности.....	4
VI. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемые с набором реагентов.....	5
VII. Отбор и подготовка образцов.....	5
VIII. Подготовка реагентов.....	6
IX. Проведение анализа.....	7
X. Учет результатов.....	8
XI. Срок годности. Условия хранения и транспортирования.....	9
XII. Объяснение символов	9

Набор реагентов выпускается в одном комплекте:

Набор рассчитан на проведение 96 (8 x 12) определений, включая контрольные, предназначен для точной постановки с возможностью дробного использования набора до одной лунки.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-М» - тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgM к вирусу клещевого энцефалита в сыворотке (плазме) крови человека.

СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-М»

Таблица 1

Характеристики реагентов	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 (концентрат x 11) – моноклональные антитела мыши к Е-антигену вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), конъюгированные с пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
К+ (контрольный положительный образец) - сыворотка крови человека, содержащая антитела класса IgM к ВКЭ, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
К- (контрольный отрицательный образец) - сыворотка крови человека, не содержащая антитела класса IgM к ВКЭ, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 3,0 мл
Антиген ВКЭ, инактивированный, лиофилизированный. Сухая пористая аморфная масса кремового цвета.	1 амп.
РРК - раствор для разведения конъюгата. Прозрачная или слегка опалесцирующая желтого цвета жидкость.	1 флакон 12,5 мл
БР – блок-раствор - для рабочего разведения исследуемых сывороток. Опалесцирующая бесцветная жидкость.	1 флакон 12,5 мл
РПР - раствор для предварительного разведения исследуемых сывороток и лиофилизированного антигена. Прозрачная или слегка опалесцирующая сине-фиолетового цвета жидкость.	1 флакон 15,0 мл
ПР (концентрат x 25) - промывочный раствор. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого 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, содержащий лимонную кислоту, ацетат натрия, раствор перекиси водорода. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 15,0 мл
ТМБ - раствор, содержащий 3,3',5,5'- тетраметилбензидиндегидрохлорид. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 1,5 мл
Стоп-реагент - раствор серной кислоты 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл
Планшет для предварительного разведения сывороток	1 шт.

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами. Реагенты помещают в коробку картонную, куда вкладывают инструкцию по применению.

Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетах 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.

III. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Оценка диагностической чувствительности и специфичности теста проводилась на клинических образцах в сравнении с референс тест-системами, предназначенными для выявления антител класса IgM к вирусу клещевого энцефалита.

Чувствительность теста составила 97,6%, специфичность – 100%.

IV. 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 из наборов разных серий.
- Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Перед использованием все реагенты набора выдержать при температуре от 18 до 24 °С в течение 30 мин.
- 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. Многократные 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).
- Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстрата.
- 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 заполняются, 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.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

V. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении К- были протестированы и определены неактивными в отношении антител класса IgM к вирусу

щевое энцефалита, к поверхностному антигену вируса гепатита В, антител к вирусу гепатита С и вирусу иммунодефицита человека ВИЧ-1,2.

- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении К+ были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В, антител к вирусу гепатита С и вирусу иммунодефицита человека ВИЧ-1,2.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спецодежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Необходимо избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы. При распыливании немедленно дезактивировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.
- Необходимо избегать контакта субстратного буфера, хромогена, стоп-реагента с кожей и слизистыми.
- После проведения ферментной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать отходы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. 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. Твердые 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 1 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.



- **Xi** Некоторые реагенты содержат 0,05 % Проклин 300. Проклин 300 0,05 % - раздражающее вещество. Может вызвать сенсибилизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

VI. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Вода дистиллированная.
- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или предварительно калибруемые одноканальные или многоканальные пипетки с изменяемым объемом для отбора жидкостей.
- Одноразовые наконечники к пипеткам.
- Инкубатор микропланшетный (37,0 ± 0,5) °С.
- Автоматический микропланшетный вошер.
- Градуированные цилиндры: 25 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Микропланшетный ридер с возможностью измерения оптической плотности (ОП) при длинах волн 450 нм и 620-680 нм.

VII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови должен производиться в соответствии с надлежащей практикой методом

попункции. Для анализа использовать неразведенную сыворотку или плазму. Образцы, содержащие видимые частицы следует осветлить центрифугированием, т.к. частицы фибрина и агрегаты могут привести к ложно-положительным результатам. Образцы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут, допустимо хранение в замороженном состоянии при температуре минус 20 °С в течение 3 мес. Во избежание осаждения фибрина плазму следует быстро размораживать в течение нескольких минут при температуре (39,0 ± 1,0) °С на водяной бане. Нельзя использовать сыворотку (плазму), замороженную и размороженную более одного раза. Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинаktivированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец сыворотки следует отбирать новым наконечником! Нельзя использовать сыворотку (плазму) загрязненную или с гемолизом или гиперлипидемией.

VIII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:

- **К-** - контрольный отрицательный образец;
- **К+** - контрольный положительный образец;
- **РРК** - раствор для разведения конъюгата;
- **БР** - блокирующий раствор для разведения исследуемых образцов;
- **РПР** - раствор для предварительного разведения исследуемых сывороток и лиофилизированного антигена;
- **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 этикетку!) и тщательно герметизировать. Для этого поместить вскрытый пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или край фольгированного пакета вернуть 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.

Рабочий промывочный раствор (ПР). Содержимое флакона с концентратом (х 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимый объем концентрата (х 25) промывочного раствора развести соответствующим объемом воды дистиллированной (см. табл. 2). 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.

Раствор антигена (концентрат х 11) – в ампулу с лиофилизированным антигеном добавить раствор РПР в объеме, указанном на этикетке ампулы, и выдержать не менее 15 мин до полного растворения содержимого. Полученный раствор концентрата антигена использовать для приготовления рабочего раствора конъюгата/антигена. Перед использованием содержимое ампулы тщательно перемешать и отобрать необходимое количество в чистую ёмкость. Оставшийся неиспользованным раствор антигена хранить в плотно закупоренном флаконе на протяжении 1 месяца при температуре от 2 до 8 °С.

Рабочий раствор конъюгата. Необходимое количество РРК перенести в чистый флакон, добавить соответствующее количество концентратов антигена и конъюгата (см. табл. 2) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Рабочий раствор конъюгата/антигена хранить не более 20 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

Субстратная смесь (СС). Развести необходимый объем СБ соответствующим объемом ТМБ (см. табл. 2). Тщательно перемешать до полного растворения. Субстратную смесь готовить перед использованием. Хранить не более 10 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в чистых флаконах.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

После вскрытия флаконов и пакета с иммуносорбентом, оставшиеся не использованными реагенты: иммуносорбент - хранить не более 6 мес., конъюгат (концентрат х 11), контрольный положительный образец (К+), контрольный отрицательный образец (К-), РРК, БР, РПР, ПР (концентрат х 25), СБ, ТМБ, Стоп-реагент хранить во флаконах, закрытых винтовыми крышками, в течение срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблице 2.

Таблица 2

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов

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

Перед использованием иммуносорбент не промывать!

1. Исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови развести в 10 раз раствором РПР. Для этого в лунки вспомогательного планшета внести дозатором по 90 мкл РПР и по 10 мкл исследуемых образцов, после чего содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием. При

и цвет раствора в лунках должен измениться с сине-фиолетового на голубовато-зеленый.

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

1 стрип - 1 лунка 100 мкл К+, 1 лунка 100 мкл К-;

2 стрипа - 1 лунка 100 мкл К+, 2 лунки по 100 мкл К-;

3 стрипа и более - 2 лунки по 100 мкл К+, 2 лунки по 100 мкл К-.

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

В остальные лунки иммуносорбента внести по 90 мкл блок-раствора и по 10 мкл предварительно введенных в 10 раз образцов исследуемых сывороток (см. п. 1).

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

4. По истечении указанного времени содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дезинфектором, с помощью промывочного устройства, планшет промыть 4 раза рабочим ПР, используя автоматический микропланшетный вошер, заливая его до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдерживая 40 с и удаляя промывочный раствор в емкость для сбора инфицированного материала.

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

6. По истечении указанного времени содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дезинфектором, с помощью промывочного устройства, планшет промыть 4 раза рабочим ПР, используя автоматический микропланшетный вошер, как указано в п. 4.

7. Во все лунки отмытых стрипов внести по 100 мкл СС. Планшет выдержать в течение 30 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 $^\circ\text{C}$.

8. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента и немедленно провести учет результатов при основном фильтре 450 нм и референс-фильтре 20-680 нм, используя ридер. Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм.

Х. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реакцию следует учитывать, если значение оптической плотности (ОП) в лунках с К+ - не менее 0,6, а среднее значение ОП К- - не более 0,2.

Положительным считать образец со значением ОП, превышающим $1,1 \times \text{ОП крит.}$, отрицательным – образец со значением ОП, меньшим, чем $0,9 \times \text{ОП крит.}$

ОП крит. рассчитывать по формуле:

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

где A - коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе.

Если значение ОП исследуемого образца превышает $0,9 \times \text{ОП крит.}$, но меньше значения $1,1 \times \text{ОП крит.}$, этот образец считать неопределенным. В этом случае необходимо повторное исследование сыворотки крови пациента на антитела ВКЭ в динамике – через 1-2 недели после первого забора крови. Желательно, чтобы повторно взятый образец анализировался с предыдущим (парные сыворотки), что позволит с большей достоверностью оценить динамику специфических антител.

I. 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 не более 10 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-готовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 3093, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или т.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.ru, www.npods.ru.

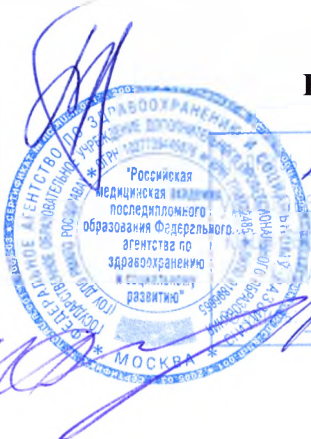
III. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Номер партии (серии)
	Каталожный номер
	Количество определений
	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

Врачу: специалист по
разработке ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»

