

«УТВЕРЖДАЮ»

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

О. Н. Шлюндин

«01» *декабрь* 2014 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-АНТИ-RUBELLA-G-АВИДНОСТЬ»

Тест-система иммуноферментная
для определения индекса авидности антител класса IgG к вирусу краснухи

Содержание

I. НАЗНАЧЕНИЕ	3
II. ПРИНЦИП ТЕСТА	3
III. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-АНТИ-RUBELLA-G-АВИДНОСТЬ».....	3
IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	4
V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	4
VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ.....	5
VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ	5
VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ	5
IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ	5
X. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	6
XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ	6
XII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ	7
XIII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ	7
Приложение	12

Набор реагентов выпускается в одном комплекте.

Набор рассчитан на проведение 48 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной дробной постановки или для одновременной постановки 48 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-RUBELLA-G-АВИДНОСТЬ» предназначен для определения индекса авидности антител класса IgG к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови человека и используется для диагностики острой инфекции.

Внимание! Расчет индекса авидности возможен лишь для сывороток, предварительно исследованных с помощью тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-RUBELLA-G» и показавших положительный результат на наличие анти-Rubella-G.

II. ПРИНЦИП ТЕСТА

При постановке ИФА в тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-RUBELLA-G-АВИДНОСТЬ» исследуемые образцы сывороток крови (предварительно разведенные РРС в 10 раз) вносят в лунки стрипов иммуносорбента с иммобилизованным лизатным антигеном вируса краснухи. При наличии в сыворотках специфических антител класса G к *Rubella virus*, образуется иммунный комплекс антиген-антитело (стадия 1).

После промывания планшета в часть лунок добавляют раствор сравнения. В другую часть лунок вносят раствор денатурирующий, который способствует разрыву связей антигенов и «ранних» IgG с низкой авидностью, которые удаляются при последующей промывке (стадия 2).

После внесения конъюгата контролируют его связывание с комплексом антиген-антитело с помощью раствора хромогена. Визуализация происходит в химической реакции пероксидазы с ТМБ-субстратным раствором с образованием цветной реакции, интенсивность желтого окрашивания пропорциональна концентрации антител в анализируемом образце. Присутствие в исследуемом образце вирусоспецифических IgG антител с низкой авидностью определяется более слабой интенсивностью окрашивания в лунках, обработанных РД (раствором денатурирующим), по сравнению с лунками, обработанными раствором сравнения.

Индекс авидности рассчитывается как соотношение оптической плотности, полученной в лунках с денатурирующим раствором (РД), к оптической плотности, полученной в лунках с раствором сравнения (РС), и выражается в процентах.

III. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-АНТИ-RUBELLA-G-АВИДНОСТЬ»

Таблица 1

Характеристика реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент – планшет полистироловый 96-луночный разборный до стрипов (или до лунок), в лунках которого сорбирован лизатный антиген вируса краснухи.	1 шт
Конъюгат – антитела к иммуноглобулину G человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 12,0 мл
K₁+ (контрольный положительный высокоавидный образец) – инактивированный. Прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
K₂+ (контрольный положительный низкоавидный образец) – инактивированный. Прозрачная или слегка опалесцирующая оранжевого цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
РРС – раствор для предварительного разведения сывороток. Прозрачная сине-фиолетового цвета жидкость.	1 флакон 12,0мл
БР – блок-раствор для рабочего разведения сывороток. Прозрачная или слегка опалесцирующая бледно-розового цвета жидкость.	1 флакон 12,0мл
РД – раствор денатурирующий для определения индекса авидности антител. Прозрачная сиреневого цвета жидкость.	1 флакон 8,0 мл
РС – раствор сравнения для определения индекса авидности антител. Прозрачная зелено-голубого цвета жидкость.	1 флакон 8,0 мл
ПР (промывочный раствор) – концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т). Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-желтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °C и встряхивании.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор – прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 12,0 мл
Стоп-реагент – водный раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами. Имеется цветовая маркировка реагентов, а также маркировка посредством штрих-кодов. Реагенты помещают в коробку картонную, куда вкладывают инструкцию по применению.

Допускается изменение базовой комплектации набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объем), при этом количество каждого реагента набора должно быть достаточным для проведения ИФА.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или	1 шт
	защитная пленка для планшетов	2 шт
	Одноразовые наконечники	16 шт
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт
	Пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или пакет полиэтиленовый с замком Zip-Lock	1 шт
	Планшет для предварительного разведения сывороток	1 шт

IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность выявления высокоавидных и низкоавидных IgG к *Rubella virus* при проверке стандартных образцов предприятия составляет 100%.

Чувствительность и специфичность выявления высокоавидных и низкоавидных IgG к *Rubella virus* при проверке стандартных образцов предприятия составляет 100%.

V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ Министерства здравоохранения РФ № 4Н от 06 июня 2012 г.).

5.2. Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой (18-25) °С.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:
 - неспецифического компонента (ПР(х 25)), который взаимозаменяем во всех тест-системах производства ООО «НПО «Диагностические системы»;
 - стоп-реагента, который может быть взаимозаменяемым в зависимости от молярности раствора.
 - ТМБ-Субстратного раствора, который взаимозаменяем во всех наборах для диагностики ToRCH-инфекций, производства ООО «НПО «Диагностические системы»

 <ul style="list-style-type: none">• Не изменять процедуру проведения анализа.• Не использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.• Не проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли.• Тщательно промывать лабораторную посуду.• Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.• Не использовать одну и ту же ванночку для внесения конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора.• Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной (деионизированной). Многократные ванночки для автоматических анализаторов сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной. Затем промыть 70% раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной.• Нельзя допускать высыхания лунок планшета иммуносорбента между отдельными операциями.• Не допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов, субстратов или ТМБ-Субстратного раствора.• Соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполнены, не допускать остатка жидкости в лунках после промывки.• Использовать валидированные пипетки и оборудование, новые наконечники для каждого образца.• Не подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света во время инкубации и хранения.		<p>При распылении образцов немедленно дезинфицировать поверхность 3% раствором хлорамина Б.</p> <p>Отходы, содержащие биологические образцы, нужно нейтрализовать до сброса в канализацию. Твердые отходы должны быть обеззаражены автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кГ/см² (0,15 МПа). Допустимо обеззараживание твердых отходов способом погружения в 3% раствор хлорамина Б (длительность дезинфекции не менее 1 часа) или другого разрешенного к промышленному выпуску и применению в РФ дезинфицирующего средства. Жидкие отходы (промывочные воды, остатки проб, растворов) обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или другого хлорсодержащего средства. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.</p>
 	<ul style="list-style-type: none">• Не пипетировать ртом.• Промывать руки после работы с набором реагентов и исследуемыми образцами• Избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, субстратного буфера, хромогена, стоп-реагента с кожей и слизистыми.	

<ul style="list-style-type: none"> В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику. 		<ul style="list-style-type: none"> Сыворотки крови, используемые при приготовлении K₁+, K₂+, содержат антитела класса IgG к вирусу краснухи, и не содержат HBsAg, антиген т р24 ВИЧ-1 и антитела к ВИЧ-1, 2 и вирусу гепатита С. При работе с реагентами набора (K₁+, K₂+) и исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
<ul style="list-style-type: none"> При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами использовать спецодежду и одноразовые перчатки. 		

УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

При утилизации и уничтожении все реагенты и материалы, являющиеся отходами, должны быть обработаны в соответствии с действующими нормативами (СанПиН 2.1.7.2790-10, СП 1.3.2322-08, МУ-287-113).

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Вода дистиллированная или деионизированная.
- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или предварительно устанавливаемые одноканальные или многоканальные пипетки с изменяемым объемом для отбора жидкостей.
- Наконечники одноразовые для пипеток переменного объема.
- Инкубатор микропланшетный (термостат) (37,0 ± 0,5) °C.
- Устройство для промывания планшетов (вошер).
- Микропланшетный ридер (анализатор иммунологический) (фильтры 450 нм и 620-680 нм).
- Бумага фильтровальная лабораторная.
- Перчатки медицинские.
- Для постановки ИФА в автоматическом режиме - любая модель ИФА-анализаторов открытого типа.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Индекс авидности рекомендуется определять для сывороток, продемонстрировавших положительный результат на наличие антител класса IgG к вирусу краснухи. Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинаktivированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост.

Сбор образцов крови проводить в соответствии с текущей практикой методом венопункции. Для анализа использовать неразведенную сыворотку/плазму. Во избежание гемолиза нужно как можно быстрее отделить плазму от эритроцитов или сыворотку от сгустка. Образцы, содержащие агрегаты или осадок, осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин (15 мин, 2-8 °C).

Образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией (сильная опалесценция) анализировать нельзя!

Образцы можно хранить в соответствии с требованиями существующих нормативных документов. Длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °C (замораживание/оттаивание не более 1 раза). Во избежание осаждения фибрина плазму размораживать в течение нескольких минут при температуре (39,0 ± 1,0) °C на водяной бане.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:

- Иммуносорбент.** Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет и вынуть планшет.
- K₁+, K₂+, РРС, Конъюгат, ТМБ-Субстратный раствор, БР, РС, РД, Стоп-реагент (0,2 моль/л).**

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

- Рабочий промывочный раствор (ПР).** Содержимое флакона с концентратом ПР (x25) тщательно перемешать. Необходимый объем концентрата развести в 25 раз соответствующим объемом воды дистиллированной или деионизированной (см. табл. № 2 и 3) и тщательно перемешать. Хранить в чистой плотно закрытой емкости не более 14 сут. при температуре от 18 до 25 °C или не более 28 сут. при температуре от 2 до 8 °C.

Таблица 2

Расход реагентов набора при ручной постановке ИФА

Количество используемых стрипов		2	4	6	8	10	12
ПР	ПР (x 25), мл	8,0	16,0	24,0	32,0	40,0	48,0
	Вода, мл	192,0	384,0	576,0	768,0	960,0	1152,0

3. Хранение неиспользованных реагентов

После вскрытия флаконов, оставшиеся не использованными жидкие компоненты набора плотно закрыть винтовыми крышками и хранить в упаковке производителя в течении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С, компоненты: Конъюгат, ТМБ-Субстратный раствор хранить не более 3-х месяцев.

После вскрытия неиспользованные стрипы иммуносорбента без рамки поместить в фольгированный пакет (не удаляя силикагель!) и тщательно герметизировать. Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета, или поместить фольгированный пакет со стрипами в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock.

После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С, при условии соблюдения герметизации.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед использованием набор выдержать 30 мин при комнатной температуре.

Проведение ИФА при ручной постановке

Перед использованием иммуносорбент не промывать!

1. В лунки вспомогательного планшета внести 90 мкл РРС и 10 мкл исследуемой сыворотки. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием, при этом фиолетово-синий цвет должен измениться на голубовато-зеленый.
2. Внести в лунки 100 мкл K_1+ , K_2+ , (в лунки двух параллельных (нечетного и четного) стрипов) – 2 лунки K_1+ , 2 лунки K_2+ , 2 лунки рабочего ПР(для контроля конъюгата).
3. В остальные лунки внести 90 мкл БР и 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток (1:10) (конечное разведение исследуемых сывороток в лунках 1:100). Каждый образец вносить попарно. Содержимое лунок тщательно перемешать пипетированием.
4. Планшет покрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.
5. С помощью промывочного устройства содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дезинфицирующим раствором и промыть планшет 4 раза рабочим ПР, осторожно заполняя лунки до краев (не менее 380 мкл в лунку), выдерживая 40 сек и удаляя промывочный раствор в ёмкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использование автоматического микропланшетного вошера. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.
6. В лунки нечетных стрипов внести по 100 мкл РС. В лунки четных стрипов – по 100 мкл РД.
7. Стрипы выдержать 10 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С.
8. Удалить содержимое лунок и промыть планшет 4 раза рабочим ПР как указано в п. 5.
9. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата.
10. Планшет покрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.
11. Удалить содержимое лунок и промыть планшет 4 раза рабочим ПР как указано в п. 5.
12. Во все лунки внести по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора.
13. Планшет выдержать в течение 20 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С.
14. Во все лунки внести по 150 мкл стоп-реагента. Учет результатов провести в течении в течение 3-4 мин.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении.

Проведение ИФА в автоматическом режиме.

Таблица 2

Расход реагентов набора при постановке ИФА на автоматических анализаторах.

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор (ПР)	
	ПР (x 25), мл	Вода, мл
12	48,0	1152,0

При постановке тест-системы на автоматическом ИФА-анализаторе следуйте ч. XI. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА, расход реагентов в соответствии с таблицей 2.

XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Учет результатов проводить 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 учет результатов при одной длине волны – 450 нм. Результаты анализа учитывать, если среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с контрольным высокоavidным положительным образцом (K_1+) и раствором сравнения – не ниже 1,000, среднее значение ОП в лунках с контрольным низкоavidным положительным образцом (K_2+) и раствором сравнения + – не ниже 0,450, а среднее значение ОП в лунках с контролем конъюгата не выше 0,150.

Индекс avidности (ИА) рассчитать по формуле:

$$\text{ИА (\%)} = \frac{\text{ОП}_{\text{РД}}}{\text{ОП}_{\text{РС}}} \times 100\%,$$

где ОП_{РД} – ОП исследуемого образца, реакция с РД;

ОП_{РС} – ОП исследуемого образца, реакция с РС.

2. Критерии достоверности. Полученные результаты достоверны, если индекс avidности K_1+ не менее 50%, а индекс avidности K_2+ не более 40%.

3. Интерпретация результатов.

Индекс avidности > 40% – сыворотка содержит высокоavidные антитела, что свидетельствует о перенесенном заболевании; индекс avidности < 40% – сыворотка содержит низкоavidные антитела, что указывает на текущую или недавно перенесенную первичную инфекцию.

Примечание: низкие значения индекса avidности специфических антител, не связанные с первичной или недавней инфекцией, возможны у больных гипергаммоглобулинемией, системными заболеваниями соединительной ткани, хроническими заболеваниями печени, у онкологических больных, при нарушениях аутоиммунного ответа и других патологиях.

II. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора 18 мес.

Срок годности серии указан на упаковке набора. Набор с истекшим сроком годности к 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 и хранение при температуре до 25°C 10 суток и до 30°C 5 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя – ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, Нижний Новгород, ул. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

Для проведения расследования и получения объективных выводов по заявленной рекламации необходимо предоставление:

1. Рекламационного набора;
2. Всех образцов кроводач пациента;
3. Протоколов исследований с использованием других методов с указанием серии, сроков годности;
4. Протоколов исследований с использованием референтных тестов с указанием серии, сроков годности.

XIII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)		Температурные пределы хранения
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)		Срок годности число/месяц/год
	Производитель		Использовать инструкцию по применению
	Каталожный номер		Содержит раздражающее вещество
	Количество определений	Code: X.X.XX	Идентификационный код
	Номер партии (серии)		

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

В.К. Пименов

СОГЛАСОВАНО

Зав.кафедрой клинической лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России
д.м.н, профессор

В. В. Долгов



СХЕМА АНАЛИЗА

1	Внести	По 90 мкл РРС и 10 мкл исследуемых образцов (проводить на планшете для предварительного разведения)
2	Внести	По 100 мкл K_1+ , K_2+ , Рабочий ПР
3	Внести	По 90 мкл БР
4	Внести	По 10 мкл исследуемых образцов, предварительно разведенных РРС (см. п. 1)
5	Инкубировать	30 мин, $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, инкубатор микропланшетный
6	Промыть планшет	Рабочий ПР, 380-400 мкл, 4 раза
7	Внести	По 100 мкл РС, РД
8	Инкубировать	10 мин, $18-25^\circ\text{C}$ в защищенном от света месте
9	Промыть планшет	Рабочий ПР, 380-400 мкл, 4 раза
10	Внести	По 100 мкл конъюгата
11	Инкубировать	30 мин, $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, инкубатор микропланшетный
12	Промыть планшет	Рабочий ПР, 380-400 мкл, 4 раза
13	Внести	По 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора
14	Инкубировать	20 мин, $18-25^\circ\text{C}$ в защищенном от света месте
15	Внести	По 150 мкл стоп-реагента, в течение 3-4 мин
16	Учет результатов	450 нм/620-680 нм или 450 нм

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ

«24» ДЕК 2014 20 год

Зав. кафедрой клинической
лабораторной
диагностики ГБОУ ДПО РМАПО
Минздрава России, д.м.н., профессор

Долгов В.В.

