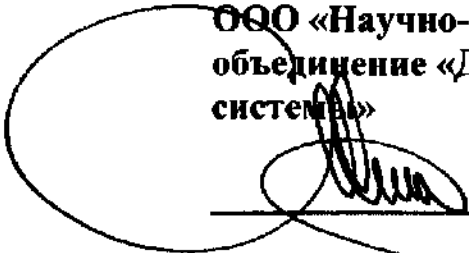


УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

**ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические
системы»**


И. Е. Колосов

21 сентября 2009 г.

№ 01-11/145-09

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

**Тест-система иммуноферментная для выявления антител к вирусу
гепатита Дельта
«ИФА-АНТИ-HDV»**

Состав набора:

иммуносорбент – рекомбинантный антиген вируса гепатита Дельта (HDVAg), сорбированный на стрипах полистиролового 96-луночного разборного планшета;

конъюгат (концентрат х 11), жидкий – глобулиновая фракция сыворотки крови реконвалесцента вирусного гепатита Дельта, содержащая анти-HDV, конъюгированная с пероксидазой хрена;

К+- (контрольный положительный образец), жидкий – сыворотка крови человека, содержащая антитела к Дельта антигену (анти-HDV), не содержащая антител к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С; инаktivированный;

К- - (контрольный отрицательный образец), жидкий – сыворотка крови человека, не содержащая анти-HDV, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С; инаktivированный;

ПР - промывочный раствор (концентрат х 25) - для промывания иммуносорбента и разведения концентрата конъюгата;

СБ - субстратный буферный раствор;

ТМБ (хромоген) – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, жидкий;

стоп-реагент – раствор серной кислоты 0,75 моль/л.

Взамен инструкции по применению от 25.12.2006 г.

Набор рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для одновременной постановки 96 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

Описание реагентов набора:

Иммуносорбент – разборный полистироловый 96-луночный планшет с прозрачными бесцветными лунками;

Конъюгат (концентрат х 11) - прозрачная или слегка опалесцирующая сине-голубого цвета жидкость;

К+ – прозрачная или слегка опалесцирующая малинового цвета жидкость;

К- - прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость;

ПР (концентрат х 25) - прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании;

СБ - прозрачная бесцветная жидкость;

ТМБ - прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость;

Стоп-реагент – прозрачная бесцветная жидкость.

Назначение

Набор предназначен для выявления антител к вирусу гепатита Дельта в сыворотке (плазме) крови человека с целью диагностики Дельта инфекции.

Меры безопасности

При работе с набором в лаборатории с исследуемыми образцами обращаться, как с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, не пипетировать ртом. Твёрдые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы из-под компонентов, лабораторную посуду и т. д.) обеззараживать погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства (СМС) или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации – не менее 1 ч. Допустимо приме-

нение другого разрешенного к применению дез. средства. Твёрдые отходы можно обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128°C под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывные воды) обезвреживать добавлением сухого хлорамина Б из расчёта 30 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) и температуре от 124 до 128°C. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.

Способ применения

Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока их годности!

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при температуре от 18 до 24 °C. Внимание! Иммуносорбент необходимо выдержать в закрытом пакете во избежание конденсации влаги в лунках планшета.

Все растворы необходимо отбирать новыми одноразовыми наконечниками, не допускать касания жидкости в наконечнике краем дозатора!

Для отбора проб использовать калиброванные пипетки переменного объема (одно- и многоканальные) с погрешностью измерения не более 5 %.

Посуду для работы с субстратной смесью (ванночки, флаконы и т.д.) в случае повторного использования необходимо сразу после работы промыть 70 % раствором этилового спирта, а затем водой дистиллированной.

1. Перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых для постановки ИФА.

1. Фотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения с настройкой «по воздуху».
2. Пипетки переменного объема (одно- и многоканальные).
3. Наконечники одноразовые для пипеток переменного объема.
4. Термостат.

5. Вошер (промывочное устройство для промывки планшета).
6. Автоматический анализатор для иммуноферментного анализа открытого типа.
7. Вода дистиллированная.
8. Бумага фильтровальная лабораторная.
9. Перчатки медицинские.

2. Приготовление рабочих растворов.

Объемы реагентов для проведения анализа на необходимом количестве стрипов приведены в таблицах № 1 и 2.

Таблица 1

Расход реагентов тест-системы на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц. х25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. х 11) (мл)	Рабочий ПР (мл)	СБ (мл)	ТМБ (мл)
12	50,0	1200,0	0,70	7,0	12,0	1,2

Таблица 2

Расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов при ручной постановке ИФА

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц. х25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. х 11) (мл)	Рабочий ПР (мл)	СБ (мл)	ТМБ (мл)
1	4,0	96,0	0,05	0,5	1,0	0,1
2	8,0	192,0	0,10	1,0	2,0	0,2
3	12,0	288,0	0,15	1,5	3,0	0,3
4	16,0	384,0	0,20	2,0	4,0	0,4
5	20,0	480,0	0,25	2,5	5,0	0,5
6	24,0	576,0	0,30	3,0	6,0	0,6
7	28,0	672,0	0,35	3,5	7,0	0,7
8	32,0	768,0	0,40	4,0	8,0	0,8
9	36,0	864,0	0,45	4,5	9,0	0,9
10	40,0	960,0	0,50	5,0	10,0	1,0
11	44,0	1056,0	0,55	5,5	11,0	1,1
12	50,0	1200,0	0,70	7,0	12,0	1,2

ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимое количество концентрата промывочного раствора отобрать в отдельную ёмкость и добавить соответствующее количество воды дистиллированной (согласно табл. № 1 и 2). Полученный раствор тщательно перемешать.

Хранение: рабочий промывочный раствор хранить не более 3-х сут при температуре от 2 до 8 °С.

К+ - контрольный положительный образец, готов к применению.

К- - контрольный отрицательный образец, готов к применению.

Конъюгат, рабочий раствор, готовить перед использованием. Необходимое количество рабочего промывочного раствора перенести в чистую ёмкость, добавить соответствующее количество тщательно перемешанного концентрата конъюгата (согласно табл. № 1 и 2) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!).

Хранение: рабочий раствор конъюгата стабилен не более 12 ч в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

СС - субстратная смесь, готовить перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (согласно табл. № 1 и 2), тщательно перемешать до полного растворения.

Хранение: допустимо хранение СС не более 10 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в чистых флаконах или специальной ёмкости, предназначенной для постановки ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

Стоп – реагент - готов к применению.

Хранение реагентов: после вскрытия флаконов оставшиеся неиспользованными реагенты набора – ПР (концентрат х 25), К-, К+, СБ, ТМБ, Стоп-реагент - хранить во флаконах, закрытых винтовыми крышками, на протяже-

нии срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

3. Подготовка исследуемых образцов.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо отбирать и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец отбирать новым наконечником. Отобранные образцы хранить в замороженном состоянии при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Допустимо хранение свежих образцов при температуре от 2 до 8 °С не более 48 ч. Образцы с выраженным гемолизом, гиперлипидемией (сильная опалесценция) и содержащие азид натрия анализу не подлежат! Образцы, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием.

4. Проведение ИФА при ручной постановке.

4.1. Вскрыть фольгированный пакет с иммуносорбентом, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета необходимое количество стрипов. Пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

4.2. Перед использованием планшет не промывать.

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

1 стрип – 1 лунка К+ и 2 лунки К-

2 стрипа – 2 лунки К+ и 2 лунки К-

3 стрипа и более – 2 лунки К+ и 3 лунки К-.

Например, при постановке на трех и более стрипов в три лунки иммуносорбента – А-1 – А-3 пипеткой переменного объема внести по 50 мкл К-, в две лунки В-1 и В-2 – по 50 мкл К+. В остальные лунки внести по 50 мкл образцов исследуемых сывороток. Далее во все лунки добавить по 50 мкл конъюгата в рабочем разведении. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате 60 мин при температуре

$(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

4.3. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала (аккуратно, с помощью вошера) и планшет промыть 4 раза рабочим ГР, заливая его до краев лунок (от 380 до 400 мкл в лунку), выдерживая 40 с и удаляя промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала.

4.4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл СС и планшет выдержать 20 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 $^\circ\text{C}$.

4.5. Реакцию остановить добавлением в лунки по 50 мкл стоп-реагента и провести учет результатов.

5. Учет результатов.

Учет результатов следует проводить спектрофотометрически при длине волны 450 нм и референс-светофилтре 620-680 нм с настройкой прибора «по воздуху». Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм.

Результаты анализа учитывать, если средние значения оптической плотности (ОП) в лунках с К+ не более 0,2, в лунках с К- - не менее 0,8.

Результаты анализа следует считать положительными, если значение ОП исследуемого образца равно или менее значения ОП критического (ОП крит.).

ОП крит. рассчитывать по формуле:

$$\text{ОП крит.} = \text{ОП К- ср.} \times A$$

где А – коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе, величину которого указывают для каждой серии в инструкции по применению, вкладываемой в коробку с набором и в паспорте на серию данного препарата.

6. Проведение ИФА в автоматическом режиме на автоматическом анализаторе типа «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN», Швейцария (возможна постановка на других моделях ИФА-анализаторов открытого типа).

1. Задают программу проведения ИФА и включают анализатор.

2. Приготовленный рабочий промывочный раствор заливают в предназначенную для него емкость, остальные рабочие растворы и реагенты помещают в специальные контейнеры или емкости, контрольные образцы К+ и К- - во флаконах, образцы исследуемых сывороток - во флаконах или пробирках в объеме не менее 300 мкл устанавливают в соответствующие штативы анализатора; помещают в анализатор необходимое количество иммуносорбентов.

3. По окончании анализа прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов К+ и К-.

4. Результаты анализа учитывать, если средние значения оптической плотности (ОП) в лунках с К+ не более 0,2, в лунках с К- - не менее 0,8. Далее учет результатов проводить аналогично п. 5.

Форма выпуска

Иммуносорбент	1 шт.
Конъюгат (концентрат х 11)	0,75 мл - 1 фл.
К+	0,75 мл - 1 фл.
К-	1,5 мл - 1 фл.
ПР (концентрат х 25)	50,0 мл - 1 фл.
СБ	15,0 мл - 1 фл.
ТМБ	1,5 мл - 1 фл.
Стоп-реагент	25,0 мл - 1 фл.

Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают инструкцию по применению.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетами или защитная пленка для ИФА планшетов - 1 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.

Срок годности. Условия транспортирования и хранения.

Срок годности набора - 12 мес.

По истечении срока годности набор использованию не подлежит.

Транспортирование наборов должно производиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С (допустимо транспортирование от 9 до 20 °С и не более 10 суток). Замораживание не допускается.

Набор должен храниться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Условие отпуска - для диагностики «in vitro». Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу 119002, Россия, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел.: (499) 241-39-22, факс: (499) 241-92-38 и 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, 8-800-555-0300.

E-mail: info@npods.nnov.ru; www.npods.ru.

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



Н. Пименов