

**ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов**

"ИФА-антиВГА-IgM"

**Тест-система иммуноферментная для выявления антител
класса М к вирусу гепатита А**

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление видоспецифических антител класса М к вирусу гепатита А в сыворотке (плазме) крови людей методом иммуноферментного анализа (ИФА).

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	мышинные антитела против тяжелых цепей IgM человека, сорбированные на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном; допускается отдельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)	1 планшет
Контрольный положительный образец (К ⁺)	инактивированный; прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтым оттенком различной интенсивности	1 фл. (1,5 мл)
Контрольный отрицательный образец (К ⁻)	инактивированный; прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтым оттенком различной интенсивности	1 фл. (0,5 мл)
Антиген ВГА (АГ _{ВГА})	инактивированный; прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (5,5 мл)
Конъюгат	5-кратный концентрат раствора антител кролика или морской свинки класса G к ВГА, меченных пероксидазой хрена; прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (1,2 мл)
Раствор для разведения конъюгата (РРК)	прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (4,8 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	прозрачная жидкость фиолетового цвета; возможно выпадение осадка	1 фл. (12 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин.	1 фл. (40 мл)
Цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБР)	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13 мл)
Хромоген (ТМБ)	раствор тетраметилбензидина; прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (0,8 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость.	1 фл. (12,5 мл)

Примечания. 1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(х25), ЦБР, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование разных серий этих реагентов или их смешение.

3. Допускается использование ТМБ из разных серий набора.

Набор может быть дополнительно укомплектован:

вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),
одноразовыми наконечниками для автоматических пипеток (16 шт.),
клеякой пленкой для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации набора позволяет одномоментное исследование 96 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 4 лунки). Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Число испл.образцов	1-4	5-12	13-20	21-26	29-36	37-44	45-52	53-60	61-68	69-76	77-84	85-92

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемом образце антител класса М к ВГА (анти-ВГА-IgM) они связываются с мышиными антителами против тяжелых цепей IgM человека (анти-IgM), сорбированными на поверхности лунок планшета, после внесения в лунки антигена ВГА (АГ_{ВГА}) и конъюгата (анти-ВГА-ПХ) комплекс (анти-IgM)-(анти-ВГА-IgM) связывается с ними с образованием комплекса [(анти-IgM)-(анти-ВГА-IgM)-(АГ_{ВГА})-(анти-ВГА-ПХ)], наличие которого выявляется по реакции с субстратом пероксидазы – тетраметилбензидином, в результате которой содержимое лунок окрашивается в голубой цвет, изменение цвета регистрируется по оптической плотности раствора в лунке планшета с помощью спектрофотометра.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность набора при исследовании сывороток стандартизированной панели предприятия или аналогичных коммерческих панелей, разрешенных к использованию в РФ, – 100 %.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Нативная сыворотка (плазма) крови человека объемом не менее 10 мкл.

Образцы до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С или до 3 мес при температуре минус 20 °С или более низкой. Допускается только однократное замораживание-размораживание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

"РУЧНАЯ" ПОСТАНОВКА

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин, термостат на 37 °С, холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(x25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

При использовании целого планшета содержимое флакона с ФСБ-Т(x25) довести водой очищенной до 1 л.

При дробной постановке использовать соотношения объемов ФСБ-Т(х25) и воды, указанные в табл. 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ФСБ-Т(х25), мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37
Вода очищенная, мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

Приготовление рабочего разведения конъюгата

Готовить не менее чем за 10 мин до использования.

Конъюгат развести РРК в соотношении 1:4.

При использовании целого планшета содержимое флакона с конъюгатом (1,2 мл) внести во флакон с РРК (4,8 мл), тщательно перемешать

При дробной постановке использовать соотношения объемов конъюгата и РРК, указанные в табл. 2 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 2

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Конъюгат, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1
РРК, мл	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	2,4	2,8	3,2	3,6	4,0	4,4

Стабильность рабочего разведения конъюгата при температуре от 18 до 25 °С не более 6 ч.

Приготовление субстратно-индикаторного раствора

Готовить перед использованием в месте, защищенном от воздействия прямого солнечного света.

ТМБ развести ЦБР в соотношении 1:20.

При дробной постановке использовать соотношения объемов ТМБ и ЦБР, указанные в табл. 3 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 2

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ТМБ, мкл	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60
ЦБР, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10	11	12

Стабильность рабочего разведения субстратно-индикаторного раствора при температуре от 18 до 25 °С не более 6 ч. в защищенном от света месте.

Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, К⁺, К⁻, РРО, АГ_{ВГА}, стоп-реагент – готовы к применению. РРО перед использованием необходимо перемешать из-за возможного выпадения осадка.

Примечание: РРО следует предохранять от длительного воздействия прямого солнечного света, чтобы исключить изменения цвета раствора.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Проведение ИФА

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из упаковки рамку планшета и необходимое число стрипов. Неиспользованные стрипы допускается хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

2. Во все лунки планшета, кроме А1, внести по 90 мкл РРО. Затем в лунку А1 внести 100 мкл К⁺, в лунки В1, С1, D1 – по 10 мкл К⁻ и в остальные – по 10 мкл исследуемых образцов.

3. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой. Инкубировать 40 мин при температуре 37°С на шейкере при частоте вращения платформы 250 об/мин.

4. С помощью промывателя удалить образцы из лунок, 4 раза промыть планшет ФСБ-Т.

Рекомендуется использовать:

- режим отмывки с переполнением – «overflow» - с внесением в лунки по 600-700 мкл рабочего промывочного раствора;

- поперечную аспирацию раствора из лунок – режим «crosswise».

Необходимо следить за полной аспирацией после каждого цикла отмывки (остаточный объем в лунках не должен превышать 10 мкл).

Сохранность иммуносорбента между операциями 15 минут.

5. Во все лунки планшета внести по 50 мкл АГ_{ВГА}. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой и выдержать 20 мин при температуре 37°С на шейкере при частоте вращения платформы 250 об/мин.

6. С помощью промывателя удалить образцы из лунок, 4 раз промыть планшет промывочным раствором, как указано в п. 4.

7. Во все лунки планшета внести по 0,050 мл рабочего разведения конъюгата.

8. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой и выдержать 20 мин при температуре 37°С на шейкере при частоте вращения платформы 250 об/мин.

9. С помощью промывателя удалить жидкость из лунок, 5 раз промыть планшет как указано в п. 4.

10. Во все лунки внести по 100 мкл субстратно-индикаторного раствора, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и выдержать 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

11. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился субстратно-индикаторный раствор) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и приступить к регистрации результатов (ОП реакционной смеси после внесения стоп-реагента стабильна не более 10 мин).

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитываются при следующих условиях:

значение ОП в лунке с K⁺ не менее 0,50;

среднее значение ОП в лунках с K⁻ не более 0,25.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Исследуемые образцы учитываются:

Рассчитывают критическое значение оптической плотности (ОП_{кр}) по формуле:

$$ОП_{кр} = 0,2 + \overline{ОП}_{K^-}$$

где $\overline{ОП}_{K^-}$ – среднее значение ОП в лунках с K⁻;

0,2 – поправочный коэффициент.

Исследуемый образец считать положительным, если ОП исследуемого образца больше или равно ОП_{кр},

Исследуемый образец считать отрицательным, если ОП исследуемого образца меньше ОП_{кр}.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

В упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Транспортирование

При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК и в учреждение, уполномоченное Росздравнадзором на проведение государственного контроля качества указанной продукции.

КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА

(ИФА-антиВГА-IgM)

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	во все лунки планшета, кроме А1, – по 0,090 мл РРО; затем в лунку А1 – 0,100 мл К ⁺ , в лунки В1, С1, D1 – по 0,010 мл К ⁻ и в остальные – по 0,010 мл исследуемых образцов
Инкубация	40 мин, 37 °С – на шейкере (250 об/мин)
Промыть	4 раза ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 50 мкл АГ _{ВГА}
Инкубация	20 мин, 37 °С – на шейкере (250 об/мин)
Промыть	4 раза ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 50 мкл рабочего разведения конъюгата
Инкубация	20 мин, 37 °С – на шейкере (250 об/мин)
Промыть	5 раз ФСБ-Т
Внести	по 100 мкл субстратно-индикаторного раствора в каждую лунку
Инкубация	25 мин, 18-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по воздуху

Август 2014 г.