

УТВЕРЖДАЮ

**Главный государственный
санитарный врач**

Российской Федерации

К.Т. Онищенко

« 25 » 10 2009 г.

№ 01-11/150-09

**ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV»
Тест-система иммуноферментная
для выявления антител к коронавирусу,
ассоциированному с атипичной пневмонией**

Набор включает в себя следующие реагенты:

иммуносорбент – полистироловые 96-луночные разборные планшеты, в лунках которых сорбирована смесь рекомбинантных антигенов: ASARS 101, ASARS 102, ASARS 103, ASARS 104;

конъюгат (концентрат x 21), жидкий – моноклональные антитела мыши против иммуноглобулинов А, G и M человека, конъюгированные с пероксидазой хрена;

K+ (контрольный положительный образец), жидкий – суррогатный белок, полученный методом химической «сшивки» с помощью глютаральдегида Fc фрагментов молекул иммуноглобулинов человека класса G из нормальной донорской сыворотки (инактивированной) и Fab 2 фрагментов молекул антител сыворотки крови животных (козы), иммунизированных рекомбинантными белками;

K- (контрольный отрицательный образец), жидкий – сыворотка крови человека в разведении 1:10, не содержащая специфические антитела к коронавирусу, ассоциированному с атипичной пневмонией, не содержащая HBsAg, антиген р24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С; инактивированный;

БР (блок-раствор) - для разведения исследуемых образцов;
РРК - раствор для разведения конъюгата;
ПР (концентрат х 25) - промывочный раствор для промывания иммуносорбента;

СБ - субстратный буферный раствор;

ТМБ - хромоген - тетраметилбензидин, жидкий;

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

Набор рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора.

Описание реагентов набора:

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

Конъюгат (концентрат х 21) - прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость;

К+ (контрольный положительный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость;

К- (контрольный отрицательный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость;

БР (блок-раствор) - прозрачная фиолетово-синего цвета жидкость, допустимо образование аморфного осадка, при встряхивании распадающегося и приводящего к помутнению раствора;

РРК – (раствор для разведения конъюгата) - прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость;

ПР - промывочный раствор (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 - субстратный буферный раствор - прозрачная бесцветная жидкость;

ТМБ - хромоген - прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость;

Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость.

Назначение

Набор предназначен для выявления специфических суммарных антител к коронавирусу, ассоциированному с атипичной пневмонией в сыворотке (плазме) крови человека.

Меры безопасности

Контрольные образцы тест-системы изготовлены из термоинактивированных сывороток. При работе с набором реагентов в лаборатории с исследуемыми образцами сывороток крови человека следует обращаться, как с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, не пипетировать ртом. Твёрдые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы из-под компонентов, лабораторная посуда и т. д.) следует 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 применение другого разрешенного к применению дезинфицирующего средства. Твёрдые отходы следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кГс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывные воды) следует 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 °С до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.

Способ применения:

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при температуре от 18 до 24 °С. Внимание: иммуносорбент необходимо выдержать в закрытом пакете во избежание конденсации влаги внутри лунок!

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

Для отбора проб использовать пипетки переменного объема (одно- и многоканальные) с погрешностью измерения, не более, указанной в паспорте на данное оборудование.

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

1. Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения с настройкой «по воздуху»;
2. Термостат;
3. Устройство для промывания планшетов (вошер);
4. Пипетки полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл, с наконечниками;
5. Пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
6. Вода очищенная;
7. Бумага фильтровальная лабораторная;
8. Перчатки резиновые или пластиковые;
9. Емкость с дезинфицирующим раствором.

2. Приготовление растворов

Все растворы необходимо отбирать одноразовыми наконечниками!

Объёмы реагентов для проведения анализа на необходимом количестве стрипов или на целом планшете приведены в таблице 1.

Таблица 1

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов

| Кол-во стрипов | ПР (рабочий раствор) | | Конъюгат (рабочий раствор) | | Субстратная смесь | |
|--------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------------|----------|-------------------|---------|
| | ПР (концентрат x 25) (мл) | Вода очищенная (мл) | Конъюгат (концентрат x 21) (мл) | РРК (мл) | ТМБ (мл) | СБ (мл) |
| 1 | 5 | 120 | 0,05 | 1,0 | 0,05 | 1,0 |
| 2 | 10 | 240 | 0,10 | 2,0 | 0,10 | 2,0 |
| 3 | 15 | 360 | 0,15 | 3,0 | 0,15 | 3,0 |
| 4 | 20 | 480 | 0,20 | 4,0 | 0,20 | 4,0 |
| 5 | 25 | 600 | 0,25 | 5,0 | 0,25 | 5,0 |
| 6 | 30 | 720 | 0,30 | 6,0 | 0,30 | 6,0 |
| 7 | 35 | 840 | 0,35 | 7,0 | 0,35 | 7,0 |
| 8 | 40 | 960 | 0,40 | 8,0 | 0,40 | 8,0 |
| 9 | 45 | 1080 | 0,45 | 9,0 | 0,45 | 9,0 |
| 10 | 50 | 1200 | 0,50 | 10,0 | 0,50 | 10,0 |
| 11 | 50 | 1200 | 0,55 | 11,0 | 0,55 | 11,0 |
| 12 (целый планшет) | 50 | 1200 | 0,60 | 12,0 | 0,60 | 12,0 |

ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Необходимое количество концентрата отобрать в отдельную емкость и развести в 25 раз водой очищенной (см. табл. 1). Полученный раствор тщательно перемешать. Приготовленный рабочий промывочный раствор хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С.

К+ - контрольный положительный образец, готов к применению.

К- - контрольный отрицательный образец, готов к применению.

БР – **блок-раствор** для разведения исследуемых образцов, раствор готов к применению. Перед употреблением содержимое флакона тщательно перемешать и отобрать необходимое количество в чистый флакон.

РРК - **раствор для разведения конъюгата**, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

Конъюгат, рабочий раствор - готовить перед использованием. Из флакона с РРК отобрать необходимое количество реагента, перенести в чистый флакон и добавить соответствующее количество концентрата конъюгата (см. табл.1). Полученный раствор осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Перед использованием выдержать не менее 10 мин при температуре от 18 до 24 °С.

Хранение: рабочий раствор конъюгата хранить не более 6 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

СС - **субстратная смесь**, готовить перед использованием. Необходимое количество СБ перенести в чистый флакон, затем добавить необходимое количество ТМБ (см. табл. 1), содержимое флакона тщательно перемешать.

Хранение: допустимо хранение СС не более 10 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в чистых флаконах.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

Хранение реагентов: после вскрытия флаконов оставшиеся неиспользованными реагенты тест-системы: ПР (концентрат х 25), К-, К+, конъюгат (концентрат х 21), РРК, СБ, ТМБ, Стоп-реагент хранить во флаконах, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

3. Подготовка исследуемых образцов.

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в

условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить не более 3-х сут при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение (до 3-х мес) допустимо при температуре минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Образцы с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией могут дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 2 до 8 °С.

4. Проведение ИФА.

4.1. Перед использованием набора необходимо вскрыть фольгированный пакет, вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов. Вставить в рамку нужное количество стрипов. Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать используя специальный зажим для пакетов (**осушитель не удалять!**). После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 месяца при температуре от 2 до 8 °С.

4.2. Перед использованием иммуносорбент промыть 2 раза ПР, осторожно заливая лунки планшета до краёв с помощью вошера (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек и удалить промывочный раствор в ёмкость с дезинфицирующим раствором. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

4.3. 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 и более - 2 лунки К+ и 3 лунки К-

В лунки стрипа, например, А-1 и В-1 дозатором пипеточным внести по 100 мкл К⁺, в 3 лунки С-1, D-1, Е-1 - по 100 мкл К⁻. В остальные лунки иммуносорбента внести по 90 мкл блок-раствора и по 10 мкл образцов исследуемых сывороток (разведение сывороток 1:10). Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краю планшета. Планшет покрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в течение 30 мин при температуре (37±0,5) °С.

4.4. Содержимое лунок аккуратно удалить, с помощью промывочного устройства в ёмкость с дезинфицирующим раствором, планшет промыть 4 раза рабочим ПР, как указано в п 4.2.

4.5. Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата и покрытый крышкой или защитной пленкой планшет выдержать в термостате в течение 30 мин при температуре (37±0,5) °С.

4.6. Содержимое лунок аккуратно удалить, с помощью промывочного устройства в ёмкость с дезинфицирующим раствором, планшет промыть 4 раза рабочим ПР, как указано в п 4.2.

4.7. Во все лунки планшета внести по 100 мкл СС и выдержать планшет в течение 20 мин при температуре от 18 до 24 °С в защищенном от света месте.

4.8. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и через 4 - 5 мин провести учет результатов.

5. Учёт результатов.

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

Результаты анализа учитывать, если среднее значение оптической плотности (ОП) растворов в лунках с К⁺ - не менее 0,600, а среднее значение ОП растворов в лунках с К⁻ - не более 0,150.

ОП крит. рассчитывают по формуле:

ОП крит. = ОП К⁻ ср. + А, 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.

Положительным следует считать образец, если ОП образца $>$ ОП крит. + 20 %.

Отрицательным следует считать образец, если ОП образца $<$ ОП крит. - 20 %.

Результаты анализа следует считать неопределенными, если

$$\text{ОП крит.} + 20 \% \leq \text{ОП образца} \leq \text{ОП крит.} - 20 \%$$

Такие образцы рекомендуется исследовать повторно через 14 дней от момента первого забора крови.

Форма выпуска

Тест-систему выпускают в виде набора:

| | 2 |
|---|-----------------|
| •Иммуносорбент – разборный планшет в герметично запаянном пакете. | 1 шт. |
| •Конъюгат (концентрат х 21) - во флаконе. | 0,8 мл - 1 шт. |
| •К+, инактивированный - во флаконе. | 1,5 мл - 1 шт. |
| •К-, инактивированный - во флаконе. | 2,0 мл - 1 шт. |
| •БР - во флаконе. | 12,5 мл - 1 шт. |
| •РРК - во флаконе. | 12,5 мл - 1 шт. |
| ПР (концентрат х 25) - во флаконе. | 50,0 мл – 1 шт. |
| •СБ - во флаконе. | 15,0 мл - 1 шт. |
| •ТМБ - во флаконе. | 1,5 мл - 1 шт. |
| •Стоп-реагент – во флаконе. | 25,0 мл - 1 шт. |

Набор упакован в коробку картонную, куда вкладывается инструкция по применению.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

| | |
|---|-------|
| Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка | 1 шт. |
| Скрепка для фольгированного пакета или пакет полиэтиленовый с замком Zip-lock | 1 шт. |

| | |
|---|--------|
| Пластиковые ванночки для жидких реагентов | 2 шт. |
| Одноразовые наконечники | 16 шт. |

Срок годности. Условия транспортирования и хранения.

Срок годности набора - 6 мес.

По истечении срока годности набор использованию не подлежит.

Транспортирование наборов должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 7 сут.

Набор должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Условие отпуска - 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.: (495) 241-39-22, факс: (495) 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.

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



В. К. Пименов