

**УТВЕРЖДЕНА**

Приказом Росздравнадзора  
от \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.  
№ \_\_\_\_\_

**УТВЕРЖДАЮ**

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



**О.Н. Шлюндин**

*О.Н. Шлюндин* 2011 г.

**ИНСТРУКЦИЯ**  
**по применению**  
**Набора реагентов**  
**«ДС-ИФА-АНТИ-HAV-G-РЕКОМБ»**  
**Тест-система иммуноферментная**  
**для выявления антител класса IgG к вирусу гепатита А**  
**на основе рекомбинантных антигенов,**  
**набор диагностический**

## Содержание

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

**Набор реагентов выпускается в одном комплекте:**

Набор рассчитан на проведение 96 определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного использования набора до одной лунки.

**I. НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-НАV-G-РЕКОМБ» Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgG к вирусу гепатита А в сыворотке (плазме) крови человека

**II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-АНТИ-НАV-G-РЕКОМБ»**

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки), в лунках которого сорбированы рекомбинантные антигены, аналоги структурных и неструктурных белков вируса гепатита А (НАV): структурный нуклеокапсидный белок VP4-VP2 и неструктурные белки VP1-P2A и P3C.	1 планшет
Конъюгат (концентрат x 11) – моноклональные антитела мыши к иммуноглобулину G человека, 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 IgG к вирусу гепатита А (анти-НАV-G), не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
К- (контрольный отрицательный образец) - сыворотка крови человека, не содержащая анти-НАV-G, 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
БР - блок раствор - для разведения исследуемых образцов. Прозрачная или слегка опалесцирующая фиолетово-синего цвета жидкость	1 флакон 12,5 мл
РРК - раствор для разведения конъюгата - при температуре от 2 до 8 °С – прозрачная желтого цвета жидкость, при температуре от 18 до 24 °С реагент становится опалесцирующим.	1 флакон 12,5 мл
ПР (концентрат x 25) - промывочный раствор. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого 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 0,75 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл

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 планшетами 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

#### Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-НАV-G-РЕКОМБ» оценивалась при тестировании образцов рабочей панели предприятия, содержащих антитела класса G к вирусу гепатита А – 100 %.

#### Специфичность

Специфичность набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-НАV-G-РЕКОМБ» оценивалась при тестировании образцов рабочей панели предприятия, не содержащих антитела класса G к вирусу гепатита А – 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+, К-, были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к вирусу гепатиту С и ВИЧ-1,2.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, 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 спец. одежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании 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 растворы, 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. Твёрдые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128°C под давлением 1,5 кгс/см<sup>2</sup> (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 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/см<sup>2</sup> (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 сенсibilизацию 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 устанавливаемые 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 фильтрах 450 нм и 620-680 нм.

## **VII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**

Сбор образцов крови должен производиться в соответствии с надлежащей практикой методом венопункции. 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 термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Образцы с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией могут дать неправильный результат.

## **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;
- **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 силикагель!) и тщательно герметизировать. Для этого поместить вскрытый пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или край фольгированного пакета свернуть 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.

**Рабочий раствор конъюгата.** Необходимое количество РРК перенести в чистый флакон, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата (см. табл. 2) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Хранить не более 12 часов 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 часов в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

**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, ПР (концентрат х 25), СБ, ТМБ, Стоп-реагент - хранить во флаконах, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

## IX. 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 конъюгата		СС	
	ПР (конц. х 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. х 11) (мл)	РРК (мл)	СБ (мл)	ТМБ (мл)
1	4	96	0,1	1,0	1,0	0,05
2	8	192	0,2	2,0	2,0	0,10
3	12	288	0,3	3,0	3,0	0,15
4	16	384	0,4	4,0	4,0	0,20
5	20	480	0,5	5,0	5,0	0,25
6	24	576	0,6	6,0	6,0	0,30
7	28	672	0,7	7,0	7,0	0,35
8	32	768	0,8	8,0	8,0	0,40
9	36	864	0,9	9,0	9,0	0,45
10	40	960	1,0	10,0	10,0	0,50
11	44	1056	1,1	11,0	11,0	0,55
12	48	1152	1,2	12,0	13,0	0,65

1. Контрольные образцы рекомендуется вносить по следующей схеме в зависимости от количества используемых стрипов:

- 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 1 лунку стрипа внести по 100 мкл К+, в 2 лунки – по 100 мкл К-. В остальные лунки внести по 90 мкл БР и по 10 мкл исследуемых образцов (образцы в лунках разведены в 10 раз). Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием, при этом фиолетово-синий цвет должен измениться на голубовато-зеленый. Если цвет не изменился, то образец для анализа не годится.

2. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в течение 30 мин при температуре  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ .

3. Содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дез. раствором, с помощью промывочного устройства, планшет промыть 6 раз рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдерживая 40 сек. и удаляя промывочный раствор в емкость с дез. раствором. Рекомендуется использование автоматического микропланшетного вошера.

4. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в течение 30 мин при температуре  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ .

5. Содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дез. раствором, с помощью промывочного устройства, планшет промыть 6 раз рабочим ПР, используя автоматический микропланшетный вошер как указано в п 3.

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

7. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 50 мкл стоп-реагента, содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета и через 3-4 минуты провести учет результатов при основном фильтре 450 нм и референс-фильтре 620-680 нм, используя ридер. Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм.

## **X. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Реакцию учитывать, если значение оптической плотности (ОП) в лунке с К+ - не менее 1,0, а среднее значение ОП К- - не более 0,2\*.

Положительным считать образец со значением ОП, равным или превышающим ОП критическое (ОП крит).

Отрицательным считать образец со значением ОП менее ОП крит.

ОП крит. следует рассчитать по формуле:

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

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

\*Отрицательные значения ОП К- и исследуемых образцов (со знаком «-») при расчете ОПкрит и анализе результатов считать равными нулю.



## XI. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности - 18 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-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 603093, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.ru, www.npods.ru.

## XII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/СЕ по in vitro диагностическим МУ)
	Производитель
	Каталожный номер
	Количество определений
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Используйте инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

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

СОГЛАСОВАНО  
Зав.кафедрой клинической  
лабораторной диагностики  
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»  
д.м.н, профессор

В.К. Пименов

