ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления антигена ротавируса человека

(Ротавирус-антиген-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Ротавирус-антиген – ИФА – Бест» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления антигена ротавируса человека методом твердофазного иммуноферментного анализа в вируссодержащих культуральных жидкостях при лабораторных исследованиях, в экстрактах фекалий при клинических исследованиях, в образцах питьевой и сточной воды, воды открытых водоемов.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 определений, включая контроли, или 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител к группоспецифическому антигену ротавирусов человека и конъюгата поликлональных антител к ротавирусам с пероксидазой хрена.

Принцип метода заключается во взаимодействии антигена ротавируса с моноклональными антителами, иммобилизованными в лунках полистиролового планшета. Комплекс «антиген–антитело» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата.

Количество связавшегося конъюгата выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена ротавируса в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– планшет разборный с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к группоспецифическому антигену ротавирусов группы А человека – 1 шт.;

– положительный контрольный образец ($К^+$), буферный раствор, содержащий инактивированный антиген ротавируса человека, – 1 фл., 1,5 мл;

– отрицательный контрольный образец ($К^–$), буферный раствор, не содержащий антиген ротавируса человека; – 1 фл., 2,5 мл;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– конъюгат поликлональных антител к ротавирусам с пероксидазой хрена – 1 фл., 13 мл;

– раствор для образцов (РО), концентрат – 1 фл., 20 мл;

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;

– раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) – 1 фл., 13 мл;

– стоп-реагент – 1 фл., 12 мл;

Дополнительно набор комплектуется:

– пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;

– ванночка для реагентов – 2 шт.;

– наконечники для пипетки на 4-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфическая активность.

Набор должен выявлять антиген ротавируса в реакции иммуноферментного анализа в СОП+ (рег. № 05-2-209) и положительном контрольном образце ($К^+$); и не выявлять в отрицательном контрольном образце ($К^–$).

Титр антигена ротавируса в СОП+ должен быть не менее 1:128 при 2-стадийной инкубации и не менее 1:32 при 1-стадийной инкубации.

При этом среднее значение оптической плотности отрицательного контрольного образца ($ОП_{ср}К^–$) не должно превышать 0,2; положительного контрольного образца ($ОП_{ср}К^+$) должно быть не ниже 0,7.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113-00 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» от 30.12.1998 г).

4.4. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4.5. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

4.6. При подготовке к проведению анализа следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

– работать в резиновых перчатках;

– не пипетировать растворы ртом;

– все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113-00.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС *(четвертичных аммониевых соединений*), спиртов, третичных аминов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм;

– термостат, поддерживающий температуру 37±1 °С;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 до 350 мкл;

– промыватель для планшетов автоматический или ручной;

– перчатки резиновые хирургические;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

– пробирки вместимостью 1,5 мл;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;

– колба вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы фекалий человека.

Для выявления антигена ротавируса в фекалиях предварительно приготовить экстракт 20 %-ной суспензии фекалий на рабочем растворе для образцов (см. п. 7.1.5.). Образцы фе-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

калий собрать в стерильные флаконы (пробирки) с пробкой вместимостью 10 мл. Фекалии в количестве 1 г (¼ флакона) встряхнуть с 5,0 мл рабочего раствора для образцов до получения гомогенной взвеси, центрифугировать при 3000 об/мин в течение 30 мин. С помощью пипетки осторожно отбирают надосадочную жидкость в чистую пробирку. Исследуют полученную надосадочную жидкость.

Для выявления АГ ротавируса использовать как свежеприготовленный образец, так и хранившейся при температуре от 2 до 8 °С в течение 24 часов, либо замороженный при минус 20°С в течение 3 месяцев.

6.2. Образцы воды.

Взятие и подготовку проб воды (водопроводной, из открытых источников или иной) необходимо проводить в соответствии с МУК 4.2.2029-05 «Санитарно-вирусологический контроль водных объектов», утвержденными Главным государственным санитарным врачом РФ 18.11.2005 г. К обработке и исследованию проб воды необходимо приступать сразу же после доставки проб в лабораторию.

Для выявления антигена ротавируса в воде необходимо провести предварительное концентрирование вируса, с использованием известных методов, рекомендованных МУК 4.2.2029-05.

Мелкодисперсные сорбенты (такие как гидроокись алюминия), использованные для концентрирования вируса, и оставшиеся в пробах, необходимо удалить, например, высокоскоростным центрифугированием.

Перед постановкой в ИФА элюат нельзя подвергать обработке хлороформом, дезинфицирующими средствами, бактериостатиками. Для удаления бактериальной микрофлоры рекомендуется использовать только фильтрацию через стерилизующие мембраны.

После элюции образцов с сорбента или трековой мембраны pH образцов необходимо довести до значения 7,2–7,4.

Полученные пробы допускается хранить до анализа не более 24 ч при температуре от 2 до 8 °С или до 3 мес при температуре минус 20 °С и ниже. При необходимости многократного исследования, пробы следует разделить на несколько порций, чтобы избежать повторного замораживания.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка к анализу.

7.1.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °С не менее 60 мин.

7.1.2. Подготовка планшета.

Непосредственно перед использованием вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов; остальные стрипы

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

снять с рамки и немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы после первого вскрытия пакета можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.1.3. Положительный и отрицательный контрольные образцы ($К^+$ и $К^–$) даны в рабочем разведении и не требуют дополнительного разведения.

После вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора. Перед использованием содержимое флакона встряхнуть.

7.1.4. Приготовление промывочного раствора.

Необходимое для проведения анализа, в зависимости от числа используемых стрипов, количество 25-кратного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином развести дистиллированной водой в 25 раз (см. таблицу). При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный рабочий фосфатно-солевой буферный раствор с твином можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.1.5. Приготовление рабочего раствора для образцов.

Содержимое флакона с концентратом раствора для образцов добавить к 480 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать.

В случае дробного использования набора отобрать из флакона необходимое количество концентрата раствора для образцов, развести дистиллированной водой в соотношении 1:24 (1 часть концентрата на 24 части дистиллированной воды).

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный рабочий раствор для разведения образцов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.1.6. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

После вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора. Перед использованием содержимое флакона встряхнуть.

Таблица расхода реагентов

Кол-во используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т×25, мл	Дистил. вода, мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1	1,0	1,0	2,0	до 50
2	2,0	2,0	4,0	до 100
3	3,0	3,0	6,0	до 150
4	4,0	4,0	8,0	до 200
5	5,0	5,0	10,0	до 250
6	6,0	6,0	12,0	до 300
7	7,0	7,0	14,0	до 350
8	8,0	8,0	16,0	до 400
9	9,0	9,0	18,0	до 450
10	10,0	10,0	20,0	до 500
11	11,0	11,0	22,0	до 550
12	12,0	12,0	24,0	до 600

7.1.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор тетраметилбензидина готов к использованию. Необходимо исключить воздействие света на раствор тетраметилбензидина.

После вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора. Перед использованием содержимое флакона встряхнуть.

7.1.8. Стоп-реагент готов к использованию. После вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.2. Проведение анализа для определения антигена ротавируса в экстрактах фекалий.

7.2.1. Внесение контрольных (К+ и К-) и исследуемых образцов.

Внесение контрольных и исследуемых образцов в лунки планшета должно занимать не более 5-7 мин, иначе время инкубации различных образцов с иммуносорбентом будет значительно отличаться, что приведет к неправильным результатам анализа.

В лунки стрипа, например А-1 и В-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца ($К^-$). В лунку С-1 внести по 100 мкл положительного контрольного образца ($К^+$).

В остальные лунки внести по 100 мкл подготовленных исследуемых образцов.

7.2.2. Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата (см п. 7.1.6). Планшет заклеить плёнкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37±1 °С.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.2.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (см п. 7.1.4), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждо-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

го стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

Внимание! *Промывку при помощи автоматического промывателя рекомендуется проводить в режиме с переполнением («Overflow») с 5-ю циклами промывки и внесением в лунки по 600–700 мкл рабочего промывочного раст-вора. При этом следует использовать поперечную аспирацию раствора из лунок (режим «Crosswise»), чтобы остаточный объем не превышал 10 мкл.*

7.2.4. Во все лунки внести по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см п. 7.1.7). Планшет поместить в защищённое от света место и выдержать в течение 25 мин при температуре (18-25) °С.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.2.5. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

7.3. Проведение анализа для определения антигена ротавируса в образцах воды, культуральной жидкости.

7.3.1. Внесение контрольных образцов (К+ и К–) и исследуемых образцов.

Внесение контрольных и исследуемых образцов в лунки планшета должно занимать не более 5-7 мин, иначе время инкубации различных образцов с иммуносорбентом будет значительно отличаться, что приведет к неправильным результатам анализа.

В лунки стрипа, например А-1 и В-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца ($К^-$). В лунку С-1 внести по 100 мкл положительного контрольного образца ($К^+$).

В остальные лунки внести по 100 мкл подготовленных исследуемых образцов.

7.3.2. Планшет заклеить плёнкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре 37±1 °С.

7.3.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (см п. 7.1.4), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

Внимание! *Промывку при помощи автоматического промывателя рекомендуется проводить в режиме с переполнением («Overflow») с 5-ю циклами промывки и внесением в лунки по 600–700 мкл рабочего промывочного раст-вора. При этом следует использовать поперечную*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

аспирацию раствора из лунок (режим «Crosswise»), чтобы остаточный объем не превышал 10 мкл.

По окончании промывания из лунок тщательно удалить остатки влаги, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

7.3.4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата (см п. 7.1.6). Планшет заклеить плёнкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре 37±1 °С.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.3.5. По окончании второй инкубации планшет промыть, как описано в п. 7.3.3.

7.3.6. Во все лунки внести по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см п. 7.1.7). Планшет поместить в защищённое от света место и выдержать в течение 25 мин при температуре (18-25) °С.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.3.7. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–650 нм; или при длине волны 450 нм. Измерение проводить не позднее 5 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать средние значения оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным и положительным контрольными образцами ($ОП_{ср}К^-$, $ОП_{ср}К^+$).

Результаты исследований учитывают только при соблюдении следующих условий:

– среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср}$ $К^-$) не более 0,20;

– среднее значение ОП в лунках с положительным контрольным образцом ($ОП_{ср}$ $К^+$) не менее 0,70.

9.2. Для оценки результатов анализа вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$ОП_{крит} = ОП_{ср}$ $(К^-) + 0,2$,

где: $ОП_{ср}$ $(К^-)$ – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.3. Результат анализа считают положительным, если значение оптической плотности в лунке с исследуемым образцом равно или превышает $ОП_{крит}$ ($ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$).

9.4. Результат анализа считают отрицательным, если значение оптической плотности в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

лунке с исследуемым образцом ниже $ОП_{крит}$ ($ОП_{обр} < ОП_{крит}$).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности набора.

В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– положительный и отрицательный контрольные образцы, конъюгат, 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, концентрат раствора для образцов, раствор тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– промывочный раствор и рабочий раствор для образцов можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 сут.

10.4. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином, стоп-реагента), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

10.5. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора «Ротавирус-антиген-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru