УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации
Г.Г. Онищенко
"28" 02 2012 г.
№ 01-11/22-10

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления антигенов ротавирусов группы А ("Рота-Антиген")

Регистрационный номер 01-11/22-10

1. Назначение.

1.1. Набор предназначен для выявления антигенов ротавирусов группы А человека в экстрактах фекалий, при контроле на производстве медицинских иммунобиологических препаратов, а также для научных исследований методом иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов (комплект № 1) или на проведение от 32 до 96 анализов (комплект № 2), включая контрольные образцы.

2. Характеристика набора.

2.1. Принцип действия.

Иммуноферментное выявление антигенов ротавирусов группы А основано на взаимодействии антигенов ротавирусов группы А, содержащихся в исследуемых образцах, с сорбированными в лунках планшета антиротавирусными иммуноглобулинами класса G. Образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляется связыванием с антиротавирусным иммуноглобулином G, меченным пероксидазой хрена, по появлению ярко-желтой окраски на этапе ферментативного превращения бесцветного субстрата в окрашенный продукт.

2.2. Состав набора:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммуносорбентом – иммуноглобулинами класса G к ротавирусу; стрипы из прозрачного пластика в рамке из непроз-рачного пластика белого цвета - 1 шт.;
- положительный контрольный образец (К+) – концентрированные антигены ротавируса штамма РМ, или Линкольн, или SA -11/1, инактивированные прогреванием; прозрачная жидкость розового цвета - 1 фл.- 0,2 мл (комп. №1)
или - 1 фл.- 0,4 мл (комп. №2);
- отрицательный контрольный образец (К–) – 5% раствор бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буферном растворе; прозрачная жидкость зеленого цвета - 1 фл.- 0,4 мл (комп. №1)
или - 1 фл.- 1,0 мл (комп. №2);
- буферный раствор для приготовления проб (БПП), концентрат (х5) – фосфатно-солевой буферный раствор;

прозрачная жидкость синего цвета - 1 фл.- 20,0 мл;

- коньюгат, концентрат (х20) - концентрат телячьих антиротавирусных иммуноглобулинов класса G, меченных пероксидазой хрена; прозрачная жидкость синего цвета - 1 фл.- 0,6 мл (комп. №1)

или - 1 фл.- 0,7 мл (комп. №2);

- фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСРТ), концентрат (х24) – ; фосфатно-солевой буферный раствор, содержащий твин; прозрачная бесцветная слегка опалесцирующая жидкость - 1 фл.- 30,0 мл;

- буферный раствор для разведения коньюгата (БРК) – фосфатно-солевой буферный раствор, содержащий казеин в концентрации 0,5 %; прозрачная бесцветная жидкость - 1 фл. - 12,0 мл;

- цитратный буферный раствор (ЦБР) – цитратный буферный раствор, содержащий 0,05 % перекиси водорода; прозрачная бесцветная жидкость - 1 фл.- 6,0 мл;

- раствор реагента тетраметилбензидина (ТМБ) – раствор тетраметилбензидина в воде очищенной в концентрации 0,5 мг/мл; прозрачная слегка голубоватая жидкость - 1 фл.- 6,0 мл;

- стоп –реагент – 0,5М раствор серной кислоты; прозрачная бесцветная жидкость - 1 фл.- 12,0 мл.

3. Аналитические и диагностические характеристики набора.

Специфическая активность набора удовлетворяет следующим условиям в реакции иммуноферментного анализа:

- набор должен выявлять антигены ротавирусов группы А в СОП$^+$ (№ 01-08, 15.02.2008) и положительном контрольном образце(К+); титр антигенов ротавирусов в СОП$^+$ должен быть не менее 1:1000;

- набор должен не выявлять антигены ротавирусов группы А в отрицательном контрольном образце (К–).

Результаты исследований учитываются, если при расчете средних значений оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным и положительным контрольными образцами:

- среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср}К–$) не превышает 0,1,

- среднее значение ОП в лунках с положительным контрольным образцом ($ОП_{ср}К+$) составляет не менее 1,0.

4. Меры предосторожности.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент (0,5 М раствор серной кислоты) обладает раздражающим дейсвием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые оболочки. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые оболочки необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать "Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР"(Москва, 1981 г.).

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

4.5. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в поещениях, 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.

5. Оборудование и материалы.

При применении набора для постановки иммуноферментного анализа используют:

- 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 объемом со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 до 350 мкл (погрешность не более 5%);
- промыватель для планшетов автоматический или ручной;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- пробирки вместимостью 2 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода очищенная.

6. Анализируемые образцы.

6.1. Приготовление исследуемых образцов копрофильтратов.

Образцы фекалий собирают в стерильные флаконы или пробирки не позднее 5 часов от момента сбора образца. Далее готовят 10-20% суспензии фекалий в буфере для приготовления проб (БПП): в пробирку с 1 мл БПП добавляют пробу фекалий в объеме ¼ от объема БПП (т.е. около 250 мкл), встряхивают в течение 15 мин до получения гомогенной взвеси, осветляют центрифугированием при 2000 об/мин в течение 20 мин, надосадочную жидкость переносят в стерильную пробирку. Полученный экстракт сразу же используют для проведения ИФА. Допускается хранение образцов при температуре минус 20 °С не более 2 месяцев.

6.2. Образцы иммунобиологических препаратов.

В процессе контроля производства иммунобиологических препаратов сбор и подготовка образцов для выявления в них антигенов ротавирусов должны производиться согласно имеющейся нормативной документации на эти препараты. Наличие антигенов ротавирусов можно контролировать в исходном сырье, промежуточных продуктах, культуральных (вируссодержащих) жидкостях и т.д.

7. Проведение анализа.

7.1. Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА.

Все растворы и реагенты перед началом работы выдерживают при температуре от 18 до 25 °С в течение 30 мин.

7.1.1. Подготовка к проведению ИФА на целом планшете (комплект № 1).

7.1.1.1 Подготовка планшета. Запаянный край пакета отрезают со стороны замка и извлекают планшет.

7.1.1.2. Положительный контрольный образец (К+), отрицательный контрольный образец (К–), БРК, ЦБР, реагент ТМБ и стоп-реагент готовы к применению.

7.1.1.3. Буфер для приготовления проб. Концентрат БПП (при хранении соли буфера могут кристаллизоваться, в этом случае перед началом работы осадок необходимо растворить при слабом нагревании) разбавляют стерильной очищенной водой в 5 раз, т.е. к 1 объему концентрата БПП добавляют 4 объема стерильной очищенной воды. При необходимости кратность разведения

концентрата буфера можно увеличить: в 25 раз – pH БПП повышается на 0,09; в 30-40 раз – pH БПП повышается на 0,12.

7.1.1.4. ФСРТ – раствор для регидратации сорбированных антител и промывки лунок планшета. Содержимое флакона с концентратом ФСРТ разводят в 575,0 мл воды очищенной. Хранят не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С.

7.1.1.5. Коньюгат. Содержимое флакона с концентратом конъюгата разводят в 12,0 мл БРК. Приготовленный раствор хранят до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С.

7.1.1.6. Субстратный раствор. К 6,0 мл раствора ЦБР добавляют 6,0 мл реагента ТМБ и перемешивают. Полученный субстратный раствор хранению не подлежит, должен быть использован сразу после приготовления.

7.1.2. Подготовка к проведению ИФА на разборном планшете (комплект № 2).

7.1.2.1. Подготовка планшета. В зависимости от числа исследуемых образцов отбирают необходимое количество стрипов, для этого отрезают запаянный край пакета со стороны замка и извлекают стрипы. Неиспользуемые стрипы помещают в пакет и тщательно закрывают замок - рекомендуется использовать в течение 1 месяца после вскрытия пакета.

7.1.2.2. Положительный контрольный образец (К+), отрицательный контрольный образец (К–), БРК, ЦБР, реагент ТМБ и стоп-реагент готовы к применению.

7.1.2.3. Буфер для приготовления проб. Концентрат БПП (при хранении соли буфера могут кристаллизоваться, в этом случае перед началом работы осадок необходимо растворить при слабом нагревании) разбавляют стерильной очищенной водой в 5 раз, т.е. к 1 объему концентрата БПП добавляют 4 объема стерильной очищенной воды. При необходимости кратность разведения концентрата буфера можно увеличить: в 25 раз – pH БПП повышается на 0,09; в 30-40 раз – pH БПП повышается на 0,12.

7.1.2.4. ФСРТ (см. таблицу). При проведении ИФА на целом планшете содержимое флакона с концентратом ФСРТ разводят в 575,0 мл воды очищенной. При проведении анализа на 4 стрипах из флакона отбирают 8,0 мл концентрата ФСРТ и разводят в 184,0 мл очищенной воды. Хранят не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С.

7.1.2.5. Коньюгат(см. таблицу). При проведении ИФА на целом планшете 0,6 мл концентрата конъюгата разводят в 12,0 мл БРК. При проведении анализа на 4 стрипах из флакона отбирают 0,2 мл концентрата конъюгата и разводят в 4,0 мл БРК. Приготовленный раствор хранят до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С.

7.1.2.6. Субстратный раствор(см. таблицу). В зависимости от количества используемых стрипов готовят необходимый объем субстратного раствора путем смешивания соответствующих объемов реагента ТМБ и ЦБР в соотношении 1:1. При проведении анализа на целом планшете требуется по 6,0 мл реагента ТМБ и ЦБР. При проведении анализа на 4 стрипах смешивают по 2,0 мл реагента ТМБ и ЦБР. Полученный субстратный раствор должен оставаться бесцветным или слегка голубоватым, хранению не подлежит, должен быть использован сразу после приготовления.

Таблица

Число стрипов	ФСРТ		Конъюгат		Субстратный раствор	
	Концентрат	Очищен. Вода	Концентрат	БРК	ЦБР	ТМБ
4	10,0 мл	230,0 мл	0,2 мл	4,0 мл	2,0 мл	2,0 мл
8	20,0 мл	460.0 мл	0,4 мл	8,0 мл	4,0 мл	4,0 мл
12	30,0 мл	690,0 мл	0,6 мл	12,0 мл	6,0 мл,	6,0 мл

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме компонентов: положительный контрольный образец (К+), отрицательный контрольный образец (К–), БРК, ЦБР, реагент ТМБ и стоп-реагент.

Растворы готовят и используют со всеми предосторожностями, описанными в разделе "Приготовление реагентов для ИФА".

7.2. Проведение ИФА.

Растворы каждого компонента тест-системы и каждого исследуемого образца отбирают с помощью индивидуального наконечника. Рекомендуется использовать только новые наконечники. При работе с тест-системой следует принимать меры предосторожности, как при работе с потенциально инфекционным материалом.

7.2.1. Регидратация сорбированных антител. Перед использованием планшет или стрипы, помещенные в рамку, промывают один раз раствором ФСРТ. Лунки заполняют 0,25 мл раствора ФСРТ и выдерживают 5 мин при температуре от 18 до 25 °С. Раствор из лунок удаляют вытряхиванием или отсасыванием с помощью автоматического промывочного устройства.

7.2.2. Внесение контрольных образцов (К+ и К–) и исследуемых проб. Одну из лунок (например, А1) оставляют незаполненной (контроль субстрата). В любую другую лунку планшета, за исключением А1, вносят 0,1 мл К+, в следующие три лунки вносят по 0,1 мл К–, во все остальные лунки – по 0,1 мл исследуемых проб. Пример схемы внесения контрольных образцов и исследуемых проб (ИП 1, ИП 2, и т.д.):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КС	ИП 4										
B	К+	ИП 2										
C	К–	ИП 6										
D	К–	ИП 7										
E	К–	ИП 8										
F	ИП 1	ИП 9										
G	ИП 2	ИП 10										
H	ИП 3	ИП 11										

7.2.3. Планшет закрывают крышкой или клейкой пленкой и выдерживают во влажной камере при температуре 37 °С в течение 30 мин на встряхивателе при высокой скорости (250 об/мин) или в течение 1 часа – без встряхивания.

7.2.4. После инкубации жидкость из лунок удаляют отсасыванием с помощью автоматического промывочного устройства или вытряхиванием в сосуд с 6 % раствором перекиси водорода, лунки промывают 3 раза раствором ФСРТ (в каждую лунку вносят не менее 0,25 мл раствора ФСРТ) и удаляют вытряхиванием или отсасыванием с помощью автоматического промывочного устройства в

сосуд с 6 % раствором перекиси водорода.

7.2.5. Внесение раствора конъюгата. Во все лунки планшета или стрипов, за исключением лунки А1, вносят по 0,1 мл раствора конъюгата. Планшет закрывают крышкой или клейкой пленкой и выдерживают во влажной камере при температуре 37 °С в течение 30 мин на встряхивателе при высокой скорости (250 об/мин) или в течение 1 часа – без встряхивания, режим инкубации должен быть таким же, как в п. 7.2.3.

7.2.6. После инкубации жидкость из лунок удаляют вытряхиванием или отсасыванием в сосуд с 6 % раствором перекиси водорода, лунки промывают 5 раз раствором ФСРТ (в каждую лунку вносят не менее 0,25 мл раствора ФСРТ) и удаляют отсасыванием с помощью автоматического промывочного устройства или вытряхиванием в сосуд с 6 % раствором перекиси водорода.

7.2.7. Перед проведением ферментативной реакции планшет или стрипы промывают водой очищенной для удаления остатков ФСРТ. Для этого во все лунки планшета вносят по 0,25 мл очищенной воды выдерживают в течение 1 мин при температуре от 18 до 25 °С, воду из лунок удаляют вытряхиванием.

7.2.8. Во все лунки планшета или стрипов вносят по 0,1 мл субстратного раствора (смесь реагента ТМБ и ЦБР) и выдерживают 15 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С.

7.2.9. В лунки планшета или стрипов, в которые был внесен субстратный раствор, вносят по 0,05 мл стоп-реагента. Учет результатов проводят не ранее, чем через 2-3 мин после остановки реакции, и не позднее, чем через 15 мин после остановки реакции.

8. Регистрация результатов

Регистрацию результатов ИФА проводят спектрофотометрически при длине волны 450 нм с помощью многоканального спектрофотометра. Установку "0" прибора проводят по лунке с контролем субстратного раствора (А1).

9. Учет результатов реакции.

9.1.Результаты учитываются, если при расчете средних значений оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным и положительным контрольными образцами:

- среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср}К–$) не превышает 0,1;
- среднее значение ОП в лунках с положительным контрольным образцом ($ОП_{ср}К+$) составляет не менее 1,0.

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 считать положительным, если значение оптической плотности в лунке с исследуемой пробой равно или превышает $ОП_{крит.}$ ($ОП_{проба} \geq ОП_{крит.}$), где $ОП_{проба}$ – ОП в лунках с исследуемой пробой.

9.4. Результат анализа считать отрицательным, если значение оптической плотности в лунке с исследуемой пробой ниже $ОП_{крит.}$ ($ОП_{проба} < ОП_{крит.}$), где $ОП_{проба}$ – ОП в лунках с исследуемой пробой.

10. Форма выпуска.

Набор выпускается в виде комплекта №1 или №2.

Набор реагентов для иммуноферментного выявления антигенов ротавирусов группы А ("Рота-Антиген"), комплект № 1

Планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммуносорбентом		1 шт.
Положительный контрольный образец (К+)	- 0,2 мл	1 фл.
Отрицательный контрольный образец (К–)	- 0,4 мл	1 фл.
Концентрат БПП	- 20,0 мл	1 фл.
Концентрат конъюгата	- 0,6 мл	1 фл.
Концентрат ФСРТ	- 25,0 мл	1 фл.
БРК	- 12,0 мл	1 фл.
ЦБР	- 6,0 мл	1 фл.
Реагент ТМБ	- 6,0 мл	1 фл.
стоп-реагент	- 10,0 мл	1 фл.

В картонной пачке с инструкцией по применению.

Набор реагентов для иммуноферментного выявления антигенов ротавирусов группы А ("Рота-Антиген"), комплект № 2

Планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммуносорбентом		1 шт.
Положительный контрольный образец (К+)	- 0,4 мл	1 фл.
Отрицательный контрольный образец (К–)	- 1,0 мл	1 фл.
Концентрат БПП	- 20,0 мл	1 фл.
Концентрат конъюгата	- 0,7 мл	1 фл.
Концентрат ФСРТ	- 25,0 мл	1 фл.
БРК	- 12,0 мл	1 фл.
ЦБР	- 6,0 мл	1 фл.
Реагент ТМБ	- 6,0 мл	1 фл.
стоп-реагент	- 10,0 мл	1 фл.

В картонной пачке с инструкцией по применению.

11. Срок годности.

Срок годности набора - 9 месяцев со дня приемки ОБТК предприятия-изготовителя. По истечению срока годности набор использованию не подлежит.

12. Условия хранения и транспортирования.

Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 дней.

Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С.

13 .Условия отпуска.

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г.Москва. Сивцев-Вражек, 41, тел.(499) 241-39-22, факс (499) 241-92-38) и в адрес предприятия – изготовителя (Общество с ограниченной ответственностью "Научно-производственное объединение АКВАПАСТ"), 195009 г. Санкт-Петербург, ул. Комсомола, 1-3 лит. М, тел/факс: (812) 542-18-09, тел.(812) 542-52-83).