

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
специфических циркулирующих иммунокомплексов,
содержащих антигены описторхисов в сыворотке (плазме) крови
(Описторх-ЦИК-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Описторх-ЦИК-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления специфических циркулирующих иммунокомплексов (ЦИК), содержащих антигены описторхисов в сыворотке (плазме) крови человека, методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Выявление специфических циркулирующих иммунокомплексов, содержащих антигены описторхисов, может быть использовано при диагностике хронического описторхоза в комплексе с другими методами, при изучении патогенеза и иммуногенеза заболеваний описторхозом в клинических и научно-исследовательских лабораториях.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализов в дублях 45 неизвестных, 3 контрольных образцов, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения ЦИК к антигенам описторхисов представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови в лунках стрипов с иммобилизованными антителами к антигенам описторхисов происходит связывание специфических иммунокомплексов и образование комплекса «антитело-ЦИК» на поверхности лунок.

После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и добавления в лунки план-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИСД М.Ю. Рукавишниковым и нач. отделения диагностики паразитарных инфекций Т.Н. Ткаченко

шета конъюгата пероксидазы хрена с иммуноглобулинами против IgG человека происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс.

Иммунный комплекс выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации циркулирующих иммунокомплексов, содержащих антигены описторхисов, в анализируемом образце сыворотки (плазмы) крови.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антителами к антигенам описторхисов, готовый для использования – 1 шт.;

- положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий специфические циркулирующие иммунные комплексы с антигенами описторхисов, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);

- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий специфические циркулирующие иммунные комплексы с антигенами описторхисов, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);

- конъюгат – моноклональные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

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

- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (12 мл);

- раствор тетраметилбензидина (ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;

- ванночками для реагентов – 2 шт.;

- наконечниками для пипетки на 5-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфическая активность:

Чувствительность выявления специфических циркулирующих иммунокомплексов, содержащих антигены описторхисов – соответствие результатов определения набором ЦИК, содержащих антигены описторхисов требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-286), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%: сред-

ние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с положительными сыворотками №1-№8 больше либо равны величине диагностического значения оптической плотности ($ОП_{№1-№8} \geq ОП_{Д}$).

Специфичность выявления специфических циркулирующих иммунокомплексов, не содержащих антигены описторхисов – соответствие результатов определения набором ЦИК, не содержащих антигены описторхисов требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-286), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с отрицательными сыворотками №9-№24 меньше величины диагностического значения оптической плотности ($ОП_{№9-№24} < ОП_{Д}$).

3.2. Титр стандартного образца предприятия СОП⁺ (рег. № 05-2-173), аттестованного ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», должен быть не менее 1:40.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

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 клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших 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, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр вертикального сканирования, 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 620-655 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ C$;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 300 мкл (погрешность не более 5%);
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы крови у обследуемых лиц в количестве не менее 0,5 мл отбирают из вены или из пальца натошак. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до $8^\circ C$ не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус $20^\circ C$ (и ниже) не более 3 мес.

Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить

центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °С в течение времени не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

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

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного (K^+) и отрицательного (K^-) контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.5. Приготовление конъюгата.

Раствор конъюгата готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента не более, чем за 5-10 мин до окончания первой инкубации и поместить в защищенное от света место.

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

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента не более, чем за 5-10 мин до окончания второй инкубации и поместить в защищенное от света место.

Раствор ТМБ после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
1	2,0	до 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.7. Стоп-реагент готов к использованию.

7.8. Внесение образцов.

В лунку А-1 внести 100 мкл положительного контрольного образца (K^+). В лунки В-1, С-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-).

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток (PPC) и по 10 мкл цельных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови в дублях.

7.9. Определение титра исследуемых образцов.

Внесение исследуемых образцов для определения титра произвести в семи последовательных двукратных разведениях в интервале от 1:10 до 1:1280. В лунки горизонтального ряда А внести по 180 мкл PPC и по 20 мкл цельных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. В лунки рядов В-Н внести по 100 мкл раствора для разведения сывороток. Каждый образец титровать, перенося по 100 мкл раствора из лунок предыдущего ряда в лунки

последующего от А до Н, тщательно перемешивая пипетированием. После раститровки из каждой лунки последнего ряда Н удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором по 100 мкл раствора, оставляя в лунках по 100 мкл.

7.10. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.11. По окончании инкубации снять липкую пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 400 мкл промывочного раствора (см п. 7.3), с последующим отсасыванием через 30 с. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Процесс промывки повторить еще 4 раза. Общее количество отмывок равно 5.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

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

7.13. Планшет заклеить пленкой и выдержать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.14. По окончании инкубации промыть планшет как описано в п. 7.12.

7.15. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

Планшет выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°C .

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

7.16. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620-655 нм. Допускается измерение оптической плотности при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху).

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности в лунках с

отрицательным контрольным образцом ($ОП_{cpK^-}$); для каждой пары лунок, содержащих образцы исследуемых сывороток (плазмы) и последовательные разведения исследуемых сывороток (плазмы) крови.

9.2. Оценка результатов:

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,80 ед. опт. плотн.

– среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,30 ед. опт. плотн.

9.3. Только при соблюдении положений п. 9.2. можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.4. На основании полученных данных вычислить диагностическое значение оптической плотности ($ОП_d$) по формуле:

$$ОП_d = ОП_{cpK^-} + 0,12,$$

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

9.5. Результат анализа считать положительным, если $ОП_{обр} \geq ОП_d$.

Результат анализа считать отрицательным, если $ОП_{обр} \leq 0,85 \times ОП_d$,

где: $ОП_{обр}$ – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом сыворотки (плазмы) крови.

Если оптическая плотность исследуемой сыворотки находится в диапазоне от $0,85 \times ОП_d$ до $ОП_d$ ($0,85 \times ОП_d < ОП_{обр} < ОП_d$), то результат следует считать неопределенным и через 2-4 недели необходим повторный анализ вновь взятого образца сыворотки крови данного человека.

9.6. Титр анализируемого образца сыворотки (плазмы) крови – наибольшее разведение анализируемого образца, при котором его оптическая плотность больше либо равна величине диагностического значения оптической плотности ($ОП_{обр} \geq ОП_d$).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ 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. Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

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

– контрольные образцы, конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток 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 можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток;

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

10.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор для предварительного разведения сывороток), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «Описторх-ЦИК-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383), 363-20-60, 363-35-56, тел./факс (383) 363-13-46, 363-35-55.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Нач. отделения диагностики
паразитарных инфекций
ЗАО «Вектор-Бест»

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

«СОГЛАСОВАНО»
зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России

Подпись _____
удостоверяю:
Специалист по кадрам

Подпись _____



Т.Н. Ткаченко

М.Ю. Рукавишников

д.м.н., профессор В.В. Долгов
«18» декабря 2011 г.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
9 листов

