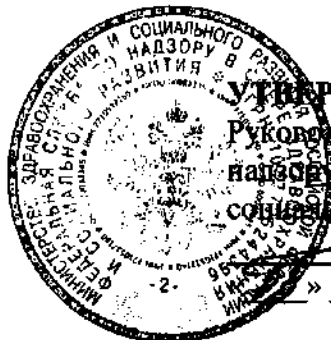




УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы по
надзору в сфере здравоохранения и
социального развития

Р.У. Хабриев

25 2006 г

Handwritten signature and initials.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации общего иммуноглобулина класса А

в сыворотке крови

(IgA общий – ИФА – БЕСТ)

Рекомендована к утверждению Научно-экспертным Советом по медицинским изделиям

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов IgA общий – ИФА – БЕСТ предназначен для определения концентрации общего иммуноглобулина класса А (IgA_{общ}) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. IgA_{общ} представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 160 кДа.

Содержание IgA_{общ} в сыворотке крови составляет 15-20% от общего количества иммуноглобулинов. Основной функцией сывороточного IgA_{общ} является нейтрализация вирусов. Его главная роль – защита дыхательных, мочеполовых путей и желудочно-кишечного тракта от инфекций.

1.3. Количественное определение содержания IgA_{общ} в сыворотке крови имеет значение для дифференциальной диагностики заболеваний печени, инфекционных заболеваний.

Инструкция составлена: сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией С.С. Решетниковым, научным сотрудником Т.И. Колочевой.

Получено на руки
25.05.06.
Борогичева

Синкина
14.04.06г.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки при одновременном использовании всех стрипов планшета.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. Во время первой инкубации происходит связывание молекулы $IgA_{общ}$ из исследуемого образца с моноклональными антителами к альфа-цепям иммуноглобулинов класса А человека, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к лямбда и каппа – цепям иммуноглобулинов человека с пероксидазой связывается с $IgA_{общ}$, иммобилизованным в ходе первой инкубации. Далее, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина в результате ферментативной реакции происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации $IgA_{общ}$ в анализируемых пробах. Концентрацию $IgA_{общ}$ в анализируемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания $IgA_{общ}$ в калибровочных пробах.

3. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к альфа-цепям иммуноглобулинов класса А человека, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно I Международного стандарта ВОЗ NIBSC 67/86 – 0; 17,5; 35; 75; 150; 300 МЕ/мл; концентрации $IgA_{общ}$ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок, готовые для использования – 6 пробирок (по 0,15 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием $IgA_{общ}$, готовая для использования – 1 пробирка (0,15 мл);
- конъюгат моноклональных антител к лямбда- и каппа – цепям иммуноглобулинов с пероксидазой хрена, концентрат - 1 флакон (1,5 мл);
- раствор для разведения сывороток, концентрат – 1 флакон (28 мл);
- раствор для разведения конъюгата – 1 флакон (12 мл);
- промывочный раствор, концентрат – 1 флакон (28 мл);

- тетраметилбензидин, готовый для использования – 1 флакон (11 мл);
- стоп-реагент (1 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.

По желанию потребителя дополнительно поставляются:

- ванночка для реагента – 1 шт;
- наконечники для пипетки на 4 – 200 мкл – 8 шт.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрёстной реакции моноклональных антител к IgA_{общ} с иммуноглобулинами классов G, E, M.

4.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания IgA_{общ} в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора IgA общий – ИФА – БЕСТ не превышает 8%.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации IgA_{общ} в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей IgA_{общ}, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 17,5-300 МЕ/мл и составляет 90-110%.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации IgA_{общ} предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 35 МЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

4.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация IgA_{общ} не превышает 1,5 МЕ/мл.

4.6. Клиническая проверка. Концентрацию IgA_{общ} измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 107 здоровых мужчин и женщин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет: концентрация IgA_{общ} составила 57-285 МЕ/мл; у 103 детей юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 1-15 лет концентрация IgA_{общ} составила 20-200 МЕ/мл.

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций IgA_{общ}, соответствующие нормальным, у обследуемого контингента людей.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

5.2. Все компоненты набора, за исключением стон-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

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

5.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

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

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

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- микроцентрифуга, позволяющая центрифугировать при 1,5-2 тыс.об/мин;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\pm 1$ °C;
- насос водоструйный;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 10, 20, 80, 100 и 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 80, 100 и 250 мкл;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 100 мл;
- колбы вместимостью 1000 мл;

- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре (+18–25°C) в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов и использовать их в течение времени не более 1 ч. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и хранить при температуре +2–8 °C в течение всего срока годности.

7.3. Подготовка калибровочных проб и контрольной сыворотки

Пробирки с калибровочными пробами и контрольной сывороткой центрифугировать на микроцентрифуге при 1,5-2 тыс.об/мин в течение 5 сек. Затем содержимое пробирок тщательно перемешать пипетированием, избегая образования пены.

После отбора части содержимого тщательно укупоренные пробирки хранить при температуре +2–8 °C не более 1 мес.

7.4. Приготовление рабочего промывочного раствора

Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора перенести в колбу вместимостью 1000 мл, добавить 672 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре +30–40 °C до полного растворения осадка.

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре +2–8 °C не более 4 недель.

7.5. Приготовление рабочего раствора для разведения сывороток

Готовится в стеклянной колбе за 30 мин до начала постановки анализа.

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

Использовать в течение 1 ч после приготовления.

7.6. Приготовление рабочего разведения анализируемых образцов сыворотки крови

Готовится в стеклянных заранее промаркированных флаконах за 5-10 мин до начала постановки анализа.

В чистый флакон с 10 мл рабочего раствора для разведения сывороток добавить 10 мкл исследуемой сыворотки и тщательно перемешать.

Использовать в течение 30 мин после приготовления.

7.7. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовится в стеклянном флаконе за 5-10 мин до окончания первой инкубации!
Использовать в течение 1 ч после приготовления.

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

Таблица

Количество используемых стрипов	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	Раствор для разведения сывороток, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл
2	0,2	1,8	4,0	96
3	0,3	2,7	6,0	144
4	0,4	3,6	8,0	192
5	0,5	4,5	10,0	240
6	0,6	5,4	12,0	288
7	0,7	6,3	14,0	336
8	0,8	7,2	16,0	384
9	0,9	8,1	18,0	432
10	1,0	9,0	20,0	480
11	1,1	9,9	22,0	528
12	1,2	10,8	24,0	576

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести во все лунки по 80 мкл рабочего раствора для разведения сывороток.

8.2. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 20 мкл каждой калибровочной пробы и по 20 мкл контрольной сыворотки (см п. 7.3). В остальные лунки внести в дубликатах по 20 мкл анализируемых образцов сыворотки крови в рабочем разведении (см п. 7.6).

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15-20 мин.

8.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $+37 \pm 1$ °C.

8.4. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием или декантированием и промыть, добавляя во все лунки по 250 мкл рабочего промывочного раствора (см п. 7.4), с последующим отсасыванием или декантированием. Процесс промывки повторить 3 раза. После каждой промывки следует тщательно удалять остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 7.7), заклеить планшет пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $+37 \pm 1$ °C.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 3 раза рабочим промывочным раствором так, как это указано в п. 8.4.

8.7. Внести во все лунки по 100 мкл тетраметилбензидина, заклеить планшет пленкой и инкубировать в темноте в течение 10–15 мин (в зависимости от степени развития окрашивания) при комнатной температуре ($+18$ – 25 °C).

8.8. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и тетраметилбензидин, по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8.9. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 20 мин.

8.10. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации $IgA_{общ}$ в калибровочных пробах (МЕ/мл).

8.11. Определить содержание $IgA_{общ}$ в контрольной сыворотке и анализируемых образцах сыворотки крови по калибровочному графику. В случае дополнительного разведения анализируемых образцов необходимо полученную концентрацию $IgA_{общ}$ умножить на фактор разведения.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Набор реагентов IgA общий – ИФА – БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2–8 °С в течение всего срока годности (6 мес). Допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 3 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

9.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора:

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

- концентрат промывочного раствора, концентрат раствора для разведения сывороток, раствор для разведения конъюгата и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре +2–8 °С в течение всего срока годности;

- калибровочные пробы, контрольную сыворотку, тетраметилбензидин и концентрат конъюгата после вскрытия флаконов и пробирок можно хранить в плотно закрытых флаконах и пробирках при температуре +2–8 °С не более 1 мес;

- рабочий раствор конъюгата и рабочий раствор для разведения сывороток можно хранить при комнатной температуре (+18–25 °С) не более 1 ч;

- рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре +2–8 °С не более 4 недель;

- построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации IgA_{общ} в контрольной сыворотке.

9.3. Для представления результатов измерений концентрации иммуноглобулина A_{общ} в мг/мл, применять коэффициент пересчета 0,014 (1 МЕ/мл IgA_{общ} = 0,014 мг/мл IgA_{общ}).

9.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

9.5. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре +2–8 °С не более 24 ч или при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

9.6. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000–1500 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре.

9.7. Если концентрации $IgA_{общ}$ в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 300 МЕ/мл, образец следует дополнительно развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

9.8. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

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

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64, 336-60-60, тел./факс (383) 336-73-46, 336-60-30

и в Институт государственного контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП»
Росздравнадзора по адресу:

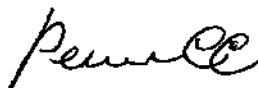
117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495) 120-60-95; 120-60-96.

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

Зав. лабораторией
ЗАО «Вектор-Бест»



С.С. Решетников

Научный сотрудник
ЗАО «Вектор-Бест»



Т.И. Колочева