

Копия сертификата

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 19.01.2009 г. № 243-Н/09



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.П. Хусаинов

19.01.2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса G к антигенам
описторхисов, трихинелл, токсокар и эхинококков в сыворотке (плазме) крови
(Гельминты-IgG-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Гельминты-IgG-ИФА-БЕСТ (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам описторхисов, трихинелл, токсокар и эхинококков в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Выявление иммуноглобулинов класса G к антигенам описторхисов, трихинелл, токсокар и эхинококков может быть использовано для серологической диагностики данных паразитарных инвазий, контроля эффективности лечения и диагностики рецидива, а также для научных исследований при гельминтозах.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализов в дублях 88 неизвестных, 8 контрольных образцов, всего 192 определений при использовании всех стрипов планшетов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения иммуноглобулинов класса G к антигенам описторхисов, трихинелл, токсокар и эхинококков представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сывороток (плазмы) крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами описторхисов, трихинелл, токсокар и эхинококков происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-

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

антитело» на поверхности лунок. После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки (плазмы) и добавления в лунки планшета конъюгата пероксидазы хрена с антителами к IgG человека происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс.

В результате ферментативной реакции, проведенной в лунках, отмытых от избытка конъюгата, с раствором тетраметилбензидина образуется окрашенный продукт, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации IgG к антигенам гельминтов в анализируемом образце сыворотки (плазмы) крови.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшеты разборные с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антигенами описторхисов, трихинелл, токсокар и эхинококков (по 6 восьмилуночных стрипов) – 2 шт.;
- положительный контрольный образец, содержащий иммуноглобулины класса G к антигенам описторхисов, трихинелл, токсокар и эхинококков, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- отрицательный контрольный образец, не содержащий иммуноглобулины класса G к антигенам описторхисов, трихинелл, токсокар и эхинококков, готовый для использования – 2 флакона (по 2,5 мл);
- конъюгат моноклональных специфических антител к IgG человека с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (2,5 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (25×ФСБ-Г) – 2 флакона (по 28 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 2 флакона (по 10 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (28 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 2 флакона (по 13 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 2 флакона (по 1 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 2 флакона (по 12 мл);
- пленка для заклеивания планшета – 4 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки на 4–200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. В ряде случаев возможно возникновение ложноположительных результатов реакции в ИФА в гетерологичной системе антиген-антитело за счет наличия общих антигенных компонентов у различных видов гельминтов. При наличии положительных результатов анализа в ИФА с несколькими антигенами проводят дополнительные исследования в раститровке. Истинно положительным считают результат ИФА с превышающим титром.

3.2. Специфическая активность:

чувствительность и специфичность набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам описторхисов, трихинелл, токсокар и эхинококков в сыворотке (плазме) крови (Гельминты-IgG-ИФА-БЕСТ) соответствуют требованиям стандартных панелей предприятия СПП (рег. № 05-2-267), СПП (рег. № 05-2-269), СПП (рег. № 05-2-266), СПП (рег. № 05-2-268), соответственно, включающих сыворотки крови здоровых доноров, не содержащих иммуноглобулины класса G к антигенам данных видов гельминтов, и сыворотки крови инвазированных больных, содержащих иммуноглобулины класса G к антигенам данных видов гельминтов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными.

Раствор стоп-реагента обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый 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. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как исследуемые образцы «сыворотки (плазмы) крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционного, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любой другой возбудитель вирусных 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.

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

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

– термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °C;

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей до 300 мкл (погрешность не более 5%);
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 и 30 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- 1,25 % раствор велтолена.

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 допускается хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут при отсутствии микробной контаминации. Замороженные образцы хранить при температуре не выше минус 20 °С не более 6 мес. В этом случае образцы можно замораживать/оттаивать только один раз, т.к. повторное замораживание/оттаивание приводит 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.

6.4. Следует обратить внимание на точное дозирование и тщательное перемешивание сывороток с раствором, используемым для их разведения. От соблюдения этих требований зависит точность и воспроизводимость результатов анализа.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты набора и образцы сывороток (плазмы) крови при температуре от 18 до 25 °С в течение времени не менее 60 мин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакеты со стрипами и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакеты, удалить из них воздух и плотно закрыть замок.

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

7.3. Приготовление рабочего фосфатно-солевого буферного раствора с твином.

Внести в мерный цилиндр необходимые количества 25×ФСБ-Т и дистиллированной воды в соответствии с таблицей расхода реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

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

Приготовленный рабочий раствор ФСБ-Т можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 3 сут.

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

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Контрольные образцы можно хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

7.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Внести во флакон необходимые количества рабочего раствора ФСБ-Т и концентрата конъюгата в соответствии с таблицей расхода реагентов, тщательно перемешать.

Рабочий раствор конъюгата можно хранить не более 3 ч при температуре от 18 до 25 °C.

Концентрат конъюгата после вскрытия флаконов допускается хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

7.6. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

Внести во флакон необходимые количества СБР и концентрата ТМБ в соответствии с таблицей расхода реагентов, тщательно перемешать.

Рабочий раствор ТМБ можно хранить в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °C не более 3 ч.

Концентрат тетраметилбензидина после вскрытия флаконов допускается хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

7.7. Подготовка исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Исследуемые образцы сывороток (плазмы) крови предварительно развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток, используя стрипы дополнительного планшета (в комплект набора не входит). Для этого внести в лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл исходной исследуемой сыворотки (плазмы), тщательно перемешать. При этом цвет раствора в лунках должен измениться с малинового на желтый. Если изменения цвета не произошло, результат анализа данной сыворотки

может быть неправильным.

Подготовленные исследуемые образцы сывороток (плазмы) крови можно хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч.

Таблица

Количество одновременно используемых стрипов	Рабочий раствор ФСБ-Т		Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор ТМБ	
	25×ФСБ-Т, мл	Вода дистиллированная, мл	Конъюгат, концентрат, мл	Рабочий раствор ФСБ-Т, мл	ТМБ, концентрат, мл	СБР, мл
1	2,0	48	0,1	1,0	0,07	1,0
2	4,0	96	0,2	2,0	0,14	2,0
3	6,0	144	0,3	3,0	0,21	3,0
4	8,0	192	0,4	4,0	0,28	4,0
5	10,0	240	0,5	5,0	0,35	5,0
6	12,0	288	0,6	6,0	0,42	6,0
7	14,0	336	0,7	7,0	0,49	7,0
8	16,0	384	0,8	8,0	0,56	8,0
9	18,0	432	0,9	9,0	0,63	9,0
10	20,0	480	1,0	10,0	0,70	10,0
11	22,0	528	1,1	11,0	0,77	11,0
12	24,0	576	1,2	12,0	0,84	12,0
13	26,0	624	1,3	13,0	0,91	13,0
14	28,0	672	1,4	14,0	0,98	14,0
15	30,0	720	1,5	15,0	1,05	15,0
16	32,0	768	1,6	16,0	1,12	16,0
17	34,0	816	1,7	17,0	1,19	17,0
18	36,0	864	1,8	18,0	1,26	18,0
19	38,0	912	1,9	19,0	1,33	19,0
20	40,0	960	2,0	20,0	1,40	20,0
21	42,0	1008	2,1	21,0	1,47	21,0
22	44,0	1056	2,2	22,0	1,54	22,0
23	46,0	1104	2,3	23,0	1,61	23,0
24	48,0	1152	2,4	24,0	1,68	24,0

7.8. Внесение контрольных образцов (К+ и К-), сывороток (плазмы) крови.

В лунки стрипов каждого типа внести в дублях по 100 мкл контрольных образцов.

В остальные лунки внести в дублях по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сывороток (плазмы) (см п. 7.7.), тщательно перемешать.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 5-7 мин.

7.8.1. Внесение образцов сыворотки (плазмы) крови для определения титра IgG.

При определении титра IgG тестирование исследуемых сывороток (плазм) произвести в семи последовательных двукратных разведениях в интервале от 1 до 1:128. В соответствующие лунки горизонтального ряда А внести по 180 мкл РРС и по 20 мкл предварительно раз-

веденных исследуемых образцов (см п. 7.7.), тщательно перемешать. В лунки рядов В-Н внести по 100 мкл РРС. 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.

Положительный и отрицательный контрольные образцы внести как описано выше.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37 ± 1 °С.

7.9. По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором (1,25 % раствор велтолена) и промыть, добавляя во все лунки по 300 мкл рабочего раствора ФСБ-Т (см п. 7.3), с последующим отсасыванием через 30 с. Общее число промывок равно 5. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. После промывки следует тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.10. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 7.5).

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 ± 1 °С.

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

7.11. По окончании второй инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором (1,25 % раствор велтолена) и промыть планшет 5 раз рабочим фосфатно-солевым буферным раствором с твином так, как это указано в п. 7.10.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.6) и инкубировать в темноте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

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

7.13. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента (при этом цвет раствора в лунках меняется на желтый).

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования 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 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Учёт результатов.

9.1.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательным и положительным контрольными образцами; для каждой пары лунок, содержащих образцы исследуемых сывороток (плазмы) и последовательные разведения исследуемых сывороток (плазмы) крови.

9.1.2. Среднее значение оптической плотности в лунках с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,8 ед. опт. плотн.

Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,20 ед. опт. плотн. (двухволновой режим измерения) и 0,25 ед. опт. плотн. (одноволновой режим измерения).

9.1.3. Оценку результатов проводить при условии полного выполнения положений п. 9.1.2.

9.1.4. На основании полученных данных вычислить диагностическое значение оптической плотности (ОП_Д) по формулам (1-4):

$$\text{ОП}_{\text{Д описторхисов}} = \text{ОП}_{\text{ср}} (\text{К-}) + 0,28 \quad (1)$$

$$\text{ОП}_{\text{Д трихинелл}} = \text{ОП}_{\text{ср}} (\text{К-}) + 0,37 \quad (2)$$

$$\text{ОП}_{\text{Д токсокар}} = \text{ОП}_{\text{ср}} (\text{К-}) + 0,32 \quad (3)$$

$$\text{ОП}_{\text{Д эхинококков}} = \text{ОП}_{\text{ср}} (\text{К-}) + 0,26 \quad (4)$$

где: ОП_{ср} (К-) – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом (стрипы с иммобилизованными соответствующими антигенами), ед. опт. плотн.

9.1.5. Результат анализа считают положительным, если ОП_{обр} ≥ ОП_Д.

Результат анализа считают отрицательным, если ОП_{обр} ≤ 0,85 × ОП_Д.

где: ОП_{обр} – среднее значение оптической плотности анализируемого образца в лунке, ед. опт. плотн.

Если оптическая плотность исследуемой сыворотки входит в интервал 0,85 × ОП_Д < ОП_{обр} < ОП_Д, результат следует считать сомнительным и через 2-4 недели необходим повторный анализ вновь взятого образца сыворотки крови данного человека.

9.1.6. 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} ≥ ОП_Д).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Набор Гельминты-IgG-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (9 мес).

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы после первого вскрытия пакета можно хранить в закрытом на замок пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор, раствор для разведения сывороток, раствор для предварительного разведения сывороток, концентрат конъюгата, концентрат 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;
- рабочий фосфатно-солевой буферный раствор с твином можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут;
- положительный и отрицательный контрольные образцы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч;
- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч.

10.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

10.4. Образцы сыворотки (плазмы) крови допускается хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут при отсутствии микробной контаминации. Замороженные образцы хранить при температуре не выше минус 20 °С не более 6 мес.

Повторное размораживание не допускается.

10.5. 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.

10.6. При постановке иммуноферментного анализа (ИФА) нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (25×ФСБ-Т, РИРС, СБР, ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

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

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

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 336-73-46, 336-60-60, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52,

и в Институт медицинской паразитологии и тропической медицины

им. Е.И. Марциновского ММА им. И.М. Сеченова по адресу:

119830, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 20, тел. (495) 246-67-64; (495) 609-16-05.

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

 Т.И. Ткаченко

Зав. лабораторией иммунологии ИМПитМ
им. Е.И. Марциновского ММА им. И.М. Сеченова

 О.Г. Полетасва

Ректор ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова Росздрава
академик РАН и РАМН, профессор
М.П.



Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"



А.В. Масыго
2020 г.