

Копия верна

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 25 мая 2007 г. № 103



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



2007 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов
класса М к антигенам описторхисов
(Описторх – IgM – ИФА – Бест)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Описторх – IgM – ИФА – Бест (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к антигенам описторхисов методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение 48 анализов сывороток в разведении 1:100 в дубликатах, включая контроли, или 12 независимых постановок ИФА по 8 определений, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Способ определения иммуноглобулинов класса М к антигенам описторхисов представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами описторхисов происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-антитело» на поверхности лунок.

После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и добавления в лунки планшета конъюгата антител к IgM человека с пероксидазой хрена происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс.

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

В результате ферментативной реакции, проведенной в лунках, отмытых от избытка конъюгата, с раствором ТМБ, образуется окрашенный продукт, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации иммуноглобулинов класса М к антигенам описторхисов в анализируемом образце сыворотки. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антигенами описторхисов, готовый для использования – 1 шт;
- положительный контрольный образец на основе инаktivированной сыворотки крови человека, готовый для использования – 1 флакон (1,3 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инаktivированной сыворотки крови здоровых доноров и не содержащий иммуноглобулинов класса М к антигенам описторхисов – 1 флакон (1,3 мл);
- конъюгат, концентрат – иммуноглобулины против IgM человека, меченные пероксидазой хрена – 1 флакон (1,3 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28 мл);
- раствор для разведения сывороток – 2 флакона (по 28 мл);
- раствор для разведения тетраметилбензидина – 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
- пленка для заклеивания планшета;
- ванночка для реагентов;
- наконечники для пипетки на 4–200 мкл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфическая активность и подлинность.

Набор должен выявлять иммуноглобулины класса М к антигенам описторхисов в реакции иммуноферментного анализа в стандартном положительном образце предприятия ($СОП^+$) и положительном контрольном образце (K^+), и не выявлять в стандартном отрицательном образце предприятия ($СОП^-$) и отрицательном контрольном образце (K^-). Чувствительность по $СОП^+$ и специфичность по $СОП^-$ составляют 100%. Значение оптической плотности контроля конъюгата должно быть не выше 0,1; $СОП^-$ и K^- (в разведении 1:100) – не

выше 0,2; СОП⁺ и К⁺ (в разведении 1:100) – не ниже 0,5. Титр специфических антител в СОП⁺ и К⁺ должен быть не менее чем 1:800.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-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.

4.3. 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.).

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 любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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;
- 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 мкл до 350 мкл;
- промывочное устройство для планшет;
- отсасыватель медицинский В-40А;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;

- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- колбы мерные вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- 6% раствор перекиси водорода.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Образцы крови у обследуемых лиц в количестве не менее 0,5 мл отбирают из вены или из пальца натошак. Сыворотку крови тщательно отделяют от сгустка и примеси эритроцитов. Сыворотки хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение 48 ч, либо при температуре минус 20 °С не более 3 месяцев. Не рекомендуется оттаивание и замораживание образцов более одного раза.

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.

Для внесения реагентов в лунки стрипов используют пипеточные дозаторы с погрешностью измерения объёмов не более 5%, для промывания лунок планшета можно использовать ручные, автоматические промыватели, а также восьми- или двенадцатиканальные пипеточные дозаторы.

Перед постановкой анализа компоненты набора и исследуемые образцы прогревают не менее 30 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 комнатной температуре (от 18 до 25 °С) не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета.

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

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

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 расхода реагентов). 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 3 сут.

7.4. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Готовить за 5-10 мин до окончания первой инкубации!

В чистый флакон перенести необходимое количество, в зависимости от числа используемых стрипов, рабочего фосфатно-солевого буферного раствора с твином, добавить соответствующий объем концентрата конъюгата (см таблицу расхода реагентов), тщательно перемешать.

Рабочий раствор конъюгата хранить до 1 ч при температуре от 18 до 25 °С.

7.5. Приготовление раствора тетраметилбензидина.

Готовить за 5-10 мин до окончания второй инкубации!

В чистый флакон перенести необходимое количество, в зависимости от числа используемых стрипов, раствора для разведения тетраметилбензидина, добавить соответствующий объем концентрата тетраметилбензидина (см. таблицу расхода реагентов), тщательно перемешать.

Раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) не более 3 ч.

Внимание! В набор вложены кювета и наконечники для пипетки, которые следует использовать только для работы с раствором тетраметилбензидина. Посуду и пипетки (наконечники), контактирующие с раствором тетраметилбензидина, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следовые количества ведут к неконтролируемому разложению тетраметилбензидина в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% раствором этилового спирта и тщательно отмыть дистиллированной водой.

7.6. Подготовка контрольных образцов.

Положительный контрольный образец (K^+) готов к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Приготовить рабочий раствор отрицательного контрольного образца (K^-): во флакон внести 1,0 мл раствора для разведения сывороток, добавить 100 мкл отрицательного контрольного образца, тщательно перемешать.

Контрольные образцы можно хранить после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2-8° С не более 2 мес.

Рабочий раствор K^- можно хранить при комнатной температуре в течение 1 ч.

7.7. Подготовка исследуемых образцов.

Готовить непосредственно перед использованием!

Исследуемые образцы развести раствором для разведения сывороток в соотношении 1:100. Для этого во вспомогательный ряд пробирок или в лунки вспомогательного планшета (в комплект набора не входит) внести по 180 мкл раствора для разведения сывороток и добавить по 20 мкл исходной исследуемой сыворотки, тщательно перемешать (разведение 1:10), затем после перемешивания 10 мкл этого разведения добавить к 90 мкл раствора для разведения сывороток (рабочий планшет). В результате получается разведение 1:100.

Подготовленные исследуемые образцы можно хранить при комнатной температуре не более 1 ч.

Таблица расхода реагентов

Количество одновременно используемых стрипов	Рабочий раствор ФСБ-Т		Рабочий раствор конъюгата		Раствор ТМБ	
	Концентрат ФСБ-Т×25, мл	Вода дистил., мл	Концентрат конъюгата, мл	Рабочий раствор ФСБ-Т, мл	Концентрат ТМБ, мкл	Раствор для разведения ТМБ, мл
1	2,0	48	0,1	1,0	70	1,0
2	4,0	96	0,2	2,0	140	2,0
3	6,0	144	0,3	3,0	210	3,0
4	8,0	192	0,4	4,0	280	4,0
5	10,0	240	0,5	5,0	350	5,0
6	12,0	288	0,6	6,0	420	6,0
7	14,0	336	0,7	7,0	490	7,0
8	16,0	384	0,8	8,0	560	8,0
9	18,0	432	0,9	9,0	630	9,0
10	20,0	480	1,0	10,0	700	10,0
11	22,0	528	1,1	11,0	770	11,0
12	24,0	576	1,2	12,0	840	12,0

7.8. В лунки планшета, заполняя их до краев, внести рабочий фосфатно-солевой буферный раствор с твином. Стрипы выдержать 1-2 мин при комнатной температуре (от 18 до 25 °С), затем содержимое лунок слить, остатки влаги удалить, постукивая перевернутыми стрипами по фильтровальной бумаге.

7.9. В лунки стрипов внести по 0,1 мл рабочих разведений контрольных образцов по следующей схеме:

при использовании 1 стрипа – 1 лунка K^+ и 2 лунки K^-

2 стрипов и более – 2 лунки K^+ и 2 лунки K^- .

Например, в лунку А-1 внести 100 мкл K^+ , в лунки В-1 и С-1 внести по 100 мкл K^- .

В лунку Н-1 внести 100 мкл раствора для разведения сывороток (контроль конъюгата). В остальные лунки внести по 100 мкл разведенных (п.8.7.) исследуемых образцов.

При определении титра антител тестирование исследуемых сывороток произвести в семи последовательных двукратных разведениях в интервале от 1:100 до 1:12800. В лунки горизонтального ряда А внести по 200 мкл разведения 1:100 исследуемых сывороток, приготовленных, как описано выше. В лунки рядов В-Н внести по 100 мкл раствора для разведения сывороток. Каждую сыворотку 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 дез. раствор по 100 мкл раствора, оставляя в лунках по 100 мкл.

Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.10. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором (6% раствор перекиси водорода) и промыть, добавляя во все лунки не менее чем по 300 мкл рабочего фосфатно-солевого буферного раствора с твином. Процесс промывки повторить 3 раза рабочим фосфатно-солевым буферным раствором с твином и 2 раза дистиллированной водой. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевёрнутом положении по фильтровальной бумаге.

7.11. Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.12. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшеты 3 раза с рабочим фосфатно-солевым буферным раствором с твином и 2 раза с дистиллированной водой так, как указано в п. 7.10.

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

Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при комнатной температуре (от 18 до 25°C) до развития синего окрашивания субстратной смеси в лунках с K^+ .

7.14. 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).

Внимание! Стоп-реагент представляет собой раствор серной кислоты. В случае попадания на кожу раствора тетраметилбензидина или стоп-реагента необходимо немедленно смыть их водой с мылом.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень (бланк) осуществлять по воздуху). Измерения проводить сразу же, но не позднее 10-15 мин после остановки реакции.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Расчеты

9.1.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.1.2. На основании полученных данных вычислить диагностическое значение оптической плотности ($ОП_d$) по формуле (1):

$$ОП_d = 3,0 \times ОП_{cp}(K^-) \quad (1),$$

где: $ОП_{cp}(K^-)$ — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.2. Оценить значения оптической плотности, полученные в лунках с контрольными образцами:

9.2.1. Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,50.

Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должны быть не более 0,20.

Значение оптической плотности в лунке с контролем конъюгата должно быть не более 0,10.

9.2.2. Оценку результатов проводить при условии полного выполнения положений п. 9.2.1.

9.3. Исследуемую сыворотку в разведении 1:100 оценивают как положительную, если значение ее оптической плотности $ОП_{обр} \geq ОП_d$

За титр положительной сыворотки принимают ее наибольшее разведение, при котором оптическая плотность сыворотки $ОП_{обр} \geq ОП_d$

Исследуемую сыворотку в разведении 1:100 оценивают как отрицательную, если значение ее оптической плотности $ОП_{обр} < ОП_d$

где: $ОП_{обр}$ — оптическая плотность в лунке с исследуемым образцом сыворотки крови;

$ОП_d$ — диагностическое значение оптической плотности по формуле (1).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Набор Описторх – IgM – ИФА – Бест должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (6 мес).

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 2 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора:

- стрипы использовать в течение срока годности набора после вскрытия упаковки.
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения тетраметилбензидина, 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, концентрат конъюгата после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2-8° С не более 2 мес.
- рабочий раствор конъюгата не хранят.
- раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) не более 3 ч .
- рабочий раствор отрицательного контрольного образца можно хранить при комнатной температуре в течение 1 ч;
- подготовленные исследуемые образцы можно хранить при комнатной температуре не более 1 ч.

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

10.4. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 48 ч или при температуре минус 20 °С (и ниже). Не рекомендуется оттаивание и замораживание образцов более одного раза.

10.5. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

10.6. Запрещается использовать реагенты из наборов другой серии и наборов других фирм-производителей.

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

По вопросам, касающимся качества набора Описторх – IgM – 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, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52,

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

117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (095) 120-60-95; 120-60-96.

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

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



Т.Н. Ткаченко

М.Д. Хусаинов

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
10 ЛИСТОВ

