

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

О «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса М к возбудителям иерсиниозов
«Иерсиния-IgM-ИФА-БЕСТ»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор «Иерсиния-IgM-ИФА-БЕСТ» предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к патогенным иерсиниям (*Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis*) в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Набор реагентов «Иерсиния-IgM-ИФА-БЕСТ» представляет собой набор реагентов, основой которого является смесь рекомбинантных антигенов иерсиний, сорбированных на поверхности лунок разборного полистиролового планшета.

Основным свойством набора является способность выявлять в сыворотках (плазме) крови человека иммуноглобулины класса М к *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* за счёт их взаимодействия с иммобилизованными антигенами (АГ). АГ представляют собой рекомбинантные белки внешней мембраны иерсиний (YOPs). Данные АГ высокоспецифичны для *Yersinia*, не обнаружены ни у каких других бактерий и характерны только для штаммов *Yersinia*, патогенных для человека. Образование комплекса антиген-антитело выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы «антиген-антитело». Реакцию останавливают добавлением стоп-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и нач. отделения ИФА гепатита С О.Н. Ястребовой

реагента. Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм. После измерения ОП в лунках на основании рассчитанного значения ОП_{крит.} результат для каждого анализируемого образца оценивается как положительный или отрицательный.

2.2. Состав набора:

- планшет разборный с иммобилизованными антигенами иерсиний – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), инактивированный – 1 фл., 0,5 мл;
- отрицательный контрольный образец (K^-), инактивированный – 1 фл., 0,5 мл;
- конъюгат (антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена) – 1 фл. или 2 фл.;
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 фл., 13 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – 1 фл., 13 мл;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – 1 фл., 3 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 4–200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса М к возбудителям иерсиниозов должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-439), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», включающей образцы, содержащие иммуноглобулины класса М к возбудителям иерсиниозов: чувствительность по IgM к возбудителям иерсиниозов – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса М к возбудителям иерсиниозов должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-439), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», включающей образцы, не содержащие иммуноглобулины класса М к возбудителям иерсиниозов: специфичность по IgM к возбудителям иерсиниозов – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами 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-287-113-00 от 29.10.98.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета 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 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- термошейкер, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, интенсивность перемешивания 400-800 об/мин;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру $(2-8)^\circ\text{C}$;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113-00.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ не более 5 суток, либо при температуре минус $(20 \pm 4)^\circ\text{C}$, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать в течение 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25) °С.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5 %.

Лиофилизированные компоненты должны быть восстановлены, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник при температуре (2-8) °С.

Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина.

При промывке лунки (стрипа, планшета) заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через край лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 с.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

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 ТМБ), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Наконечники для пипеток (автоматических дозаторов) следует использовать однократно.

Запрещается повторное использование планшета для предварительного нанесения сывороток.

Посуду (ванночки), используемые для работы с растворами конъюгата и тетраметилбензида, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

В случае повторного использования посуду (ванночки) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки) для раствора тетраметилбензида сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

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 (МУ-231-113-00 от 29.10.98).

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов.

7.2.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см. таблицу) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объема или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

Хранение: до 5 суток при температуре (2-8) °С.

7.2.2. Растворы конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток.

7.2.2.1. Приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – до 3 месяцев при (2–8) °С или до 12 месяцев при минус (20±4) °С. Допускается 3-х кратное замораживание концентрированного раствора конъюгата.

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

7.2.2.2. Тщательно взболтать содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (РК). Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество (см.

таблицу) концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

Хранение: конъюгат в рабочем разведении хранению не подлежит.

7.2.3. Раствор ТМБ

Внимание! Раствор ТМБ готов к использованию. Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с раствором ТМБ.

Непосредственно перед использованием отобрать в пластиковую ванночку только необходимое в соответствии с числом используемых стрипов количество раствора ТМБ (см. таблицу). Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).

Хранение: в течение всего срока годности набора при температуре (2–8) °С.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Раствор конъюгата в рабочем разведении												
Концентрированный раствор конъюгата, мкл	α^*	$2 \times \alpha$	$3 \times \alpha$	$4 \times \alpha$	$5 \times \alpha$	$6 \times \alpha$	$7 \times \alpha$	$8 \times \alpha$	$9 \times \alpha$	$10 \times \alpha$	$11 \times \alpha$	$12 \times \alpha$
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Раствор ТМБ												
Раствор ТМБ, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

* α = ____ мкл (значение α указано в инструкции и в паспорте на данную серию наборов).

7.3. Проведение анализа

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой.

Упакованные таким образом стрипы хранить при температуре (2-8) °С до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1), концентрированный раствор конъюгата (п. 7.2.2.1).

7.3.2. Во все лунки стрипов внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток (PPC). В одну лунку внести 10 мкл K^+ , в 2 другие лунки — по 10 мкл K^- . Во все остальные лунки стрипов внести по 10 мкл исследуемых образцов. При этом цвет раствора в лунках изменится на синий.

Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным перемешиванием (инпирование не менее 4 раз).

Лунки заклеить плёнкой и инкубировать при $(37 \pm 1)^\circ$ в термошейкере при 500 об/мин 30 мин или при $(37 \pm 1)^\circ$ без шейкирования 90 мин.

За 5 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.2.2).

7.3.3. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки 5 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

***Внимание!** Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (400 мкл рабочего промывочного раствора). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.*

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевёрнутыми стрипами по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге. Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.3.4. Внести во все лунки по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении.

***Внимание!** Для внесения раствора конъюгата в рабочем разведении использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

Лунки заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.3.5. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть 5 раз промывочным раствором, удалить влагу как описано выше.

7.3.6. Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ (п. 7.2.3).

***Внимание!** Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, прилагаемые к набору.*

Стрипы поместить на 25 мин в защищенное от света место при температуре (18-25) °С.

7.3.7. Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реagenta и через 2-3 мин измерить оптическую плотность (ОП).

*Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела.
При попадании – промыть большим количеством воды.*

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом не более 0,2 ($ОП_{ср}K^- \leq 0,2$).

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом не менее 0,6 ($ОП_{ср}K^+ \geq 0,6$);

Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,3$$

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

Если $ОП_{ср}(K^-)$ имеет отрицательное значение, считать её равной нулю.

Для интерпретации результатов исследования сывороток использовать коэффициент позитивности (КП):

$$КП = ОП_{иссл. сыв.} / ОП_{крит}$$

При $КП < 1,0$ результат расценивать как отрицательный.

$КП \geq 1,0$ – результат положительный.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2-8) °С. Замораживание не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

10.4. 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 (2-8) °С в течение всего срока годности набора;

– контрольные образцы, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твн-ном, раствор для разведения сывороток, раствор для разведения конъюгата, раствор для предварительного разведения, раствор тетраметилбензилина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора;

– концентрированный раствор конъюгата можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение 3 месяцев с момента приготовления или при температуре минус (20±4) °С до конца срока годности набора;

– промывочный раствор можно хранить при температуре (2-8) °С до 5 суток с момента приготовления.

По вопросам, касающимся качества набора «Иерсиния-IgM-ИФА-БЕСТ» обращаться:
в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу: 630128, г. Новосибирск-128, а/я 102,
тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел. (383) 227-68-23.

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Нач. отделения ИФА гепатита С
ЗАО «Вектор-Бест»

О.Н. Ястребова

Зам. директора по научной работе ГБУЗ
«Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского»



В.И. Шумский