

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2014 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
суммарных антител к возбудителю бруцеллёза
«Бруцелла-антитела-ИФА-БЕСТ»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Бруцелла-антитела-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления суммарных антител к возбудителю бруцеллеза в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 (12×8) анализов, включая контроли (по 3 лунки в каждой постановке).

Набор предназначен для ручной постановки анализа (предусмотрено дробное использование набора по одному стрипу). Возможно использование набора в автоматических ИФА-анализаторах открытого типа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

Основой набора реагентов является смесь белков бруцелл, сорбированных на поверхности лунок разборного полистиролового планшета.

Во время первой инкубации, при наличии в исследуемых образцах антител к бруцеллам, они связываются с антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок планшета. Во время второй инкубации смесь пероксидазных конъюгатов антител к IgA, IgM и IgG человека связывается с антителами, иммобилизованными в ходе первой инкубации.

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

Далее, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы «антиген-антитело».

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–650 нм; или при длине волны 450 нм. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце антител к бруцеллам.

2.2. В состав набора входят:

- планшет разборный с иммобилизованными антигенами бруцелл – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащий антитела к возбудителю бруцеллеза – 1 фл., 0,5 мл;
- отрицательный контрольный образец (K^-), на основе инаktivированной сыворотки крови человека, не содержащий антитела к возбудителю бруцеллеза – 1 фл., 0,5 мл;
- конъюгат (смесь моноклональных антител к IgA, IgM и IgG человека, меченных пероксидазой хрена) – 1 фл., 13,0 мл;
- раствор для разведения сывороток (РС) – 1 фл., 13,0 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28,0 мл;
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) – 1 фл., 13,0 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12,0 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ*

3.1. Результат качественного определения набором суммарных антител к возбудителю бруцеллеза должен соответствовать требованиям инструкции по применению стандартной панели предприятия сывороток крови, содержащих суммарные антитела к возбудителю бруцеллеза, аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» (рег. № 05-2-531): чувствительность по суммарным антителам к возбудителю бруцеллеза – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором суммарных антител к возбудителю бруцеллеза должен соответствовать требованиям инструкции по применению стандартной панели предприятия сывороток крови, не содержащих суммарные антитела к

возбудителю бруцеллеза, аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» (рег. № 05-2-531): специфичность по суммарным антителам к возбудителю бруцеллеза – 100%.

* Дополнительно в данной инструкции будут приведены данные об оценке диагностических чувствительности и специфичности, полученные в ходе клинических испытаний данного набора.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

При работе с исследуемыми и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 от 01.05.08 и МУ-287-113 от 30.12.98;
- утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– спектрофотометр вертикального сканирования, 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 – 650 нм;

– термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий проводить встряхивания при 500-800 об/мин и температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

– термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 до 350 мкл;

– промывочное устройство для планшета;

– перчатки медицинские диагностические одноразовые;

- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующие растворы.

Примечание:

При использовании автоматических анализаторов рекомендуется связаться с изготовителем набора реагентов с целью получения возможной дополнительной информации от службы технической поддержки.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2-8) °С не более 5 суток, либо при температуре минус (20 ± 3) °С, если необходимо более длительное хранение.

Образцы, 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 образцы сыворотки или подвергавшиеся многократному (более 3-х циклов) замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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 %.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами хранить при температуре от 2 до 8 °С, использовать в течение всего срока годности набора.

При промывке лунки стрипа (*платишета*) заполнять полностью. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не

должно быть «заростов». Не оставлять вошер на ночь заполненным водой или промывочным раствором. В конце рабочего дня промыть дистиллированной водой. Обязательно, как минимум, раз в неделю промыть всю систему вошера с «замачиванием» 70% спиртом или другим раствором, рекомендованным инструкцией к прибору.

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 в наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Запрещается повторное использование планшета для предварительного нанесения сывороток.

Наконечники для пипеток (автоматических дозаторов) следует использовать однократно.

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 (*четвертичных аммониевых соединений*), спиртов, третичных аминов.

Посуду (ванночки), используемые для работы с остальными реагентами, не следует обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента. В случае повторного использования посуду (ванночки) промыть проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

Посуду (ванночки), используемые для работы с ТМБ, в случае повторного использования, сразу после работы промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

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

7.1. Приготовление реагентов.

7.1.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В соответствии с используемым количеством стрипов необходимый объём ФСБ-Т×25 развести соответствующим объемом дистиллированной воды (см. таблицу). Тщательно перемешать.

Хранение: Промывочный раствор хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или при температуре (18-25) °С не более 7 дней. После вскрытия флакона ФСБ-Т×25 хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

7.1.2. Контрольные образцы

Контрольные образцы K^+ и K^- готовы к использованию.

Хранение: После вскрытия флаконов контрольные образцы хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

7.1.3. Конъюгат.

Внимание! Конъюгат готов к применению. Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток и ванночку для реагентов.

Перед использованием тщательно перемешать содержимое флакона и отобрать в пластиковую ванночку необходимое, в соответствии с числом используемых стрипов, количество конъюгата (см. таблицу). Остатки конъюгата из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с конъюгатом).

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
Приготовление промывочного раствора												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	флакон
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 700
Конъюгат												
Конъюгат, 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

7.1.4. Раствор ТМБ

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

Для работы с ТМБ рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток и ванночку для реагентов.

Непосредственно перед использованием отобрать в пластиковую ванночку 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.

7.2. Проведение анализа

7.2.1. Подготовить к работе необходимое количество стрипов. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в целфленовый 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. 7.1.1).

Все растворы должны быть температуры (18-25) °С.

7.2.2. Во все лунки стрипов внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток (РС). В одну лунку планшета внести 10 мкл положительного контрольного образца (K^+), в 2 лунки – по 10 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), в остальные лунки – по 10 мкл исследуемых образцов.

Внесение образцов должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).

Примечание: При смешивании РС с исследуемыми и контрольными образцами происходит изменение цвета раствора в лунке планшета. Степень изменения цвета у различных образцов может отличаться.

7.2.3. Лунки заклеить плёнкой и инкубировать при (37 ± 1) °С в термошейкере при 500 об/мин 30 мин.

7.2.4. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (см. п. 7.1.1), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа.

Внимание! Каждую лунку при промывке следует 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 использовать перекрестную аспирацию рас-

творя из лунок (режим «*cross aspiration*»).

Если остаточный объём промывочного раствора в лунках превышает 10 мкл, то необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

Не допускать высыхания лунок планшетов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.2.5. В каждую лунку внести по 100 мкл конъюгата (п. 7.1.3). Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, прилагаемые к набору.

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

7.2.7. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть 5 раз промывочным раствором, удалить влагу как указано в п.7.2.4.

7.2.8. Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ (п. 7.1.4). 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 $(18-25)^\circ\text{C}$.

7.2.9. Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты 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 620-650 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:

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом не менее 0,8 ($ОП\ K^+ \geq 0,8$);

– значения оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом не более 0,2 ($ОП\ K^- \leq 0,2$).

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.

Для интерпретации результатов исследования сывороток использовать коэффициент позитивности (КП), который рассчитывается для каждого образца по формуле:

$$КП = ОП_{иссл. сыв.} / ОП_{крит.}$$

где $ОП_{иссл. обр}$ – оптическая плотность в лунках с исследуемыми образцами.

Если $ОП\ K^-$ и $ОП_{иссл. обр.}$ имеют отрицательные значения, при расчёте $ОП_{крит}$ и анализе результатов считать их равными нулю.

Исследуемый образец оценивать как:

– отрицательный, т.е. не содержащий антитела к возбудителю бруцеллеза, если значение $КП < 1,0$;

– положительный, т.е. содержащий антитела возбудителю бруцеллеза, если значение $КП \geq 1,0$.

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.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2-8) °С. Замораживание компонентов набора 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 хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора;

– контрольные образцы, конъюгат, 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, раствор тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора;

– промывочный раствор хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или при температуре (18-25) °С не более 7 дней.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «Бруцелла-антитела-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



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
десять листов

[Handwritten signature]