

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 11 » июля



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И/ИЛИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG ПРОТИВ *Toxoplasma gondii*
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
Токсоплазма IgG**

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Toxoplasma gondii относится к простейшим. Это внутриклеточный паразит, способный инфицировать и человека, и животных. Окончательным хозяином являются кошки, в ЖКТ которых проходит фаза полового размножения *T. gondii*. Человек может инфицироваться через контакт с зараженным животным или при употреблении в пищу мяса, не прошедшего достаточную тепловую обработку. В большинстве случаев у взрослых и подростков инфекция протекает субклинически или со слабо выраженными симптомами.

Приобретенная инфекция часто сопровождается лимфаденитами, повышением температуры, лимфоцитозом, миалгией. Хориоретиниты являются известным проявлением приобретенной инфекции, но также могут быть и результатом врожденного токсоплазмоза. Для ВИЧ-инфицированных пациентов частым проявлением токсоплазмоза является энцефалит. Наиболее уязвимыми для инфицирования являются пациенты с ослабленным иммунитетом и беременные женщины (воздействие на плод), особенно в первые 6 месяцев беременности. В течение этого периода у плода идет развитие ЦНС, поэтому инфицирование приводит к негативным последствиям, таким как хориоретиниты, церебральное кальцифицирование, психомоторные нарушения, гидроцефалия. Уровень определяемых антител у взрослых варьирует в зависимости от таких факторов, как возраст, географические условия, метод определения.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип действия данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела класса IgG против токсоплазмы (если они есть в образце) связываются с антигеном токсоплазмы, адсорбированным на твердой фазе (в лунках планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение следующей инкубации антитела против IgG человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом антиген токсоплазмы – антитело. После цикла промывки в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание антител класса IgG в образцах и калибраторах прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество		Состояние
	1й вариант комплектации	2й вариант комплектации	
Планшет МТР	1 x 96 лунок	2 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	2 x 50 мл	Концентрат Конс.
Раствор для разведения DIL	1 x 20 мл	2 x 20 мл	Концентрат Конс.

Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Калибраторы CAL	1 x 2.5 мл 4 x 1.5 мл	1 x 2.5 мл 4 x 1.5 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 или на 192 лунки.

2.2.1. Специфические реагенты

• **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplates:** 1 или 2 планшета на 96 лунок, каждая из которых покрыта очищенным и инактивированным антигеном токсоплазмы. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

• **Калибраторы (CAL) / Calibrator:** растворы на основе сыворотки крови. Содержат IgG против токсоплазмы в следующих концентрациях: 15, 30, 60, 120 и 240 МЕ/мл. Готовы к использованию. Растворы калибраторов 30, 60, 120, 240 МЕ/мл красного цвета, раствор калибратора 15 МЕ/мл – голубого. Консервант: NaN_3 (<0.1%). Калибраторы аттестованы по 2 Международному Стандарту (SSI), 1980.

• **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержащий мышинные моноклональные антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO). Готов к использованию. Раствор розового цвета. Консервант: неомицин.

2.2.2. Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

• **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing Solution (concentrated):** фосфатный буферный раствор, содержащий Твин-20. Консервант: тимеросал (< 0.05%). Перед использованием разведите необходимое количество концентрата дистиллированной водой в 20 раз. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C.

• **Раствор для разведения (20x) Sample Diluent (concentrated):** раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Жидкость красного цвета. Консерванты: NaN_3 (< 0.1%). Непосредственно перед применением разведите в 20 раз подготовленным к использованию промывочным раствором (см. выше). Приготовленный раствор для разведения хранить не более 30 суток при +2...8°C.

• **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** раствор на основе сыворотки крови, не содержит антител класса IgG к токсоплазме. Готов к использованию. Раствор красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Может использоваться как:

- 1) Отрицательный контроль в качественном анализе.
- 2) Калибратор с концентрацией 0 МЕ/мл в количественном анализе.

• **Раствор ТМБ (TMB):** Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H_2O_2 . Готов к использованию.

• **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1N HCl. Готов к использованию.

• **Бумага для заклеивания планшета (CPA).**

• **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе более 500 образцов, полученных от пациентов, не имеющих иммунитета к токсоплазме. Специфичность составляет 99,1%.

3.2. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе более 200 образцов, полученных от пациентов, перенесших в прошлом токсоплазмоз. Чувствительность составляет 97,1%.

3.3. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матриксе образца. Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина).

3.4. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выражается минимальным количеством определяемого аналита, выявляемым с помощью данного набора. Предел детекции составляет 0,6 МЕ/мл (99% доверительный интервал). Эта величина была определена как концентрация аналита, отличающаяся от нулевого калибратора на три стандартных отклонения.

3.5. Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициент вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител класса IgG против токсоплазмы.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	± (МЕ/мл)	S.D.	C.V. %	Кол-во репликатов
a	15.8	±	0.3	1.9	10
b	25.0	±	1.16	4.64	10
c	78.68	±	5.7	7.2	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	± (МЕ/мл)	S.D.	C.V. %	Кол-во постановок
a	24.70	±	3.00	12.20	10
b	38.50	±	4.80	12.40	10
c	97.40	±	14.20	14.60	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты набора разных серий (см. п.2.2.1). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неверным результатам анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Не смотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирачный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированный цилиндр для разведения реагентов.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Дистиллированная вода.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0-3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2..8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. Для хранения в течение более длительного времени образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:300 с помощью приготовленного Раствора для разведения (см. п.2.2.2.). Например: 10 мкл образца + 2990 мкл раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей или калибраторов и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank).

7.2. Внесите по 100 мкл контролей или калибраторов и разведенных образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли и калибраторы готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Внесите 100 мкл приготовленного Раствора для разведения в лунку для обнуления.

7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **60±5 минут при 37±2°C**.

7.5. Удалите содержимое лунок и промойте их **4 раза**, внося при каждой промывке **по 350 мкл** разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.6. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Конъюгата.

7.7. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **30±2 минут при 37±2°C**.

7.8. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.5).

7.9. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Раствора ТМБ.

7.10. Инкубируйте в течение **10 минут при 37±2°C** или **15 минут при комнатной температуре (+18...25°C)**. Избегайте попадания света на планшет.

7.11. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ*

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить область кривой.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Качественный анализ

Определить оптическую плотность (ОП) отрицательного контроля и калибратора Cut-off (15 МЕ/мл: пороговое значение). Присутствие или отсутствие антител класса IgG против определяется путем сравнения ОП образца с ОП калибратора Cut-off.

Образцы с ОП ниже ОП калибратора Cut-off признают не реактивными (не содержащими антитела класса IgG против *Toxoplasma gondii*).

Образцы с ОП выше ОП калибратора Cut-off признают реактивными (содержащими антитела класса IgG против *Toxoplasma gondii*).

Область значений ОП $\pm 10\%$ от ОП калибратора Cut-off является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требует повторного тестирования для подтверждения.

9.2 Количественный анализ

Отрицательный контроль является первой точкой калибровочной кривой (0 МЕ/мл антител класса IgG против *Toxoplasma gondii*).

Калибровочная кривая строится в линейных координатах, где по оси X откладывают концентрацию каждого калибратора, а по оси Y – ОП каждого калибратора. Соответствующие концентрации исследуемых образцов (МЕ/мл) получаются путем интерполяции ОП образца на калибровочной кривой.

Образцы с концентрацией IgG антител менее 15 МЕ/мл признают не реактивными.

Образцы с концентрацией IgG антител более 30 МЕ/мл признают реактивными.

Образцы с концентрацией IgG антител в диапазоне от 15 до 30 МЕ/мл признают слабо-реактивными.

Определение концентрации образцов

Например:

Описание	ОП 450 nm	Концентрация антител IgG против <i>Toxoplasma gondii</i>	ОП 405 nm
Калибратор 0 МЕ/мл	0.010		0.003
Калибратор 15 МЕ/мл	0.291		0.097
Калибратор 30 МЕ/мл	0.698		0.232
Калибратор 60 МЕ/мл	1.375		0.458
Калибратор 120 МЕ/мл	2.064		0.688
Калибратор 240 МЕ/мл	2.746		0.915
Образец	1.780	85 МЕ/мл	0.590

Внимание: Отрицательный контроль = Калибратор 0 МЕ/мл

Путем интерполяции на калибровочной кривой полученная концентрация антител IgG класса против токсоплазмы составляет 85 МЕ/мл.

Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

Описание	Условие
Отрицательный контроль	< 0.200
ОП Кал 240 МЕ/мл / ОП Кал 15 МЕ/мл	> 6.08
ОП Кал 15 МЕ/мл / ОП Кал 0 МЕ/мл	> 7.16

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.3. Интерпретация результатов

– Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию антител IgG класса против токсоплазмы.

– Реактивные и сомнительные образцы признают положительными по содержанию антител IgG класса против токсоплазмы.

Образцы сыворотки крови, полученные от одного пациента с промежутком времени, должны сравниваться только при исследовании в одном и том же анализе. В этом случае 60% увеличение ОП во втором образце является значимым признаком недавней или развивающейся инфекции. В этом случае образцы тестируются на присутствие специфических IgM.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

При определении уровня иммунитета пациента против *Toxoplasma gondii* присутствие антител класса IgG не исключает возможность текущей инфекции. Таким образом, определение специфических антител класса IgM является основным методом для ранней диагностики острой инфекции. В случае заболевания раннее вмешательство значительно уменьшает риск. Однако результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:300

Реагенты	Лунки	Blank	Калибраторы и контроли	Образцы
Калибраторы и контроли	NEG CAL	-----	100 мкл	-----
Образцы		-----	-----	100 мкл
Раствор для разведения	DIL	100 мкл	-----	-----

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат	CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------	------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин
- Промывка: 4 x 350 мкл

Раствор ТМБ	TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------	-----	---------	---------	---------

- Инкубация: вариант А: 37±2°C, 10 мин; вариант В: комнатная температура, 15 мин

Стоп-реагент	STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------	------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 nm.

еральный директор
О «Компания Алкор Био»

оводитель лаборатории разработки ИФА-систем
О «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.com



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 4 (силь) лист об

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 11 » июля 2011г



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АВИДНОСТИ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG к *Toxoplasma gondii*
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
Токсоплазма IgG-авидность**

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Toxoplasma gondii относится к внутриклеточным паразитам класса простейших. Клинические проявления инфекции разнообразны. Около 80-90% токсоплазменной инфекции, встречающейся у иммунокомпетентных подростков или взрослых, протекает бессимптомно. Клинические симптомы (лимфаденит, лимфоцитоз и миалгия) проявляются в легкой форме. Первичная токсоплазменная инфекция в течение беременности приводит к врожденному токсоплазмозу плода с возникновением хориоретинита и повреждений ЦНС. Особенно высока частота возникновения отрицательных последствий при инфицировании в течение первых 6 месяцев беременности. Идентификация первичной токсоплазменной инфекции затруднена тем, что иммуноглобулины М (IgM), типичные маркеры недавней инфекции, могут присутствовать в сыворотке крови в течение многих месяцев и даже лет после инфицирования. По этой причине особенно полезным для идентификации недавней инфекции оказывается определение авидности специфических IgG. Первичный иммунный ответ на инфекцию характеризуется IgG-антителами с низкой авидностью, которые связываются со специфическим антигенным сайтом, но легко диссоциируют.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип действия данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА), в котором сыворотки пациентов, внесенные в лунки микропланшета в дубликатах, реагируют с антигеном токсоплазмы, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок. После первой инкубации планшет промывают, а парные лунки инкубируют с разными буферными растворами, один из которых содержит мочевины. Мочевина вызывает диссоциацию ранее образовавшегося комплекса антиген токсоплазмы - антитело. Степень диссоциации зависит от авидности антител.

После следующего цикла промывки связанные с твердой фазой антитела вступают в реакцию с антителами против IgG человека, меченными пероксидазой хрена, которая, в свою очередь, реагирует с раствором ТМБ. Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Процент авидности вычисляют как отношение между оптическими плотностями в парных лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет MTP	1x96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Concentrated
Раствор для разведения образцов DIL	1 x 20 мл	Концентрат Concentrated
Контроль Низкоавидный CTR BA	1 x 2 мл	Лиофилизирован Lyophilized
Контроль Высокоавидный CTR AA	1 x 2 мл	Лиофилизирован Lyophilized
Реагент для диссоциации DISS	1 x 10 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат	1 x 14 мл	Готов к использованию

CONJ		Ready for use
Раствор ТМБ	1 x 14 мл	Готов к использованию
TMB		Ready for use
Стоп реагент	1 x 14 мл	Готов к использованию
STOP		Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Специфические реагенты

– **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplate:** Планшет из 12 стрипов по 8 лунок: внутренняя поверхность лунок покрыта очищенным и инактивированным антигеном токсоплазмы. Неиспользованные стрипы поместить в пластиковый пакет (прилагается) и плотно закрыть; хранить при температуре +2...8°C.

• **Низкоаavidный контроль (CTR BA) / Low Avidity Control:** 1 флакон. Лиофилизированный препарат красного цвета. Изготовлен на основе сыворотки крови, содержащей низкоаavidные IgG человека к токсоплазме. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Перед использованием восстановите содержимое флакона в 2 мл дистиллированной или деионизованной воды. Восстановленный реагент хранить не более 2 месяцев при температуре +2...8°C. Для длительного хранения заморозить при -20°C.

• **Высокоаavidный контроль (CTR AA) / High Avidity Control:** 1 флакон. Лиофилизированный препарат синего цвета. Изготовлен на основе сыворотки крови, содержащей высокоаavidные IgG человека к токсоплазме. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Перед использованием восстановите содержимое флакона в 2 мл дистиллированной или деионизованной воды. Восстановленный реагент хранить не более 2 месяцев при температуре +2...8°C. Для длительного хранения заморозить при -20°C.

• **Реагент для диссоциации (DISS) / Dissociating Reagent:** 1 флакон (10 мл). Содержит буферный раствор с мочевиной. Готов к использованию.

• **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон (14 мл). Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержащий мышинные моноклональные антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. Готов к использованию. Раствор розового цвета. Консервант: неомицин.

2.2.2. Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

• **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing Solution (concentrated):** 1 флакон (50 мл). Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: тимеросал (< 0.05%). Перед использованием разведите необходимое количество концентрата в соотношении 1:20 дистиллированной водой. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C.

• **Раствор для разведения образцов 20x (DIL) / Sample Diluent (concentrated):** 1 флакон (20 мл). Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Жидкость красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Непосредственно перед применением разведите концентрат в соотношении 1:20 подготовленным к использованию промывочным раствором (см. выше). Приготовленный раствор для разведения хранить не более 30 суток при +2...8°C.

• **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон (14 мл). Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H_2O_2 . Готов к использованию.

• **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон (14 мл). 1N HCl. Готов к использованию.

• **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate seales.**

• **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность

Диагностическую специфичность данного метода оценивали на панели клинических образцов от пациентов с перенесенной ранее или повторной инфекцией. Диагностическая специфичность составляет 90%.

3.2. Диагностическая чувствительность

Диагностическую чувствительность данного метода оценивали на панели образцов от пациентов с первичной инфекцией. Диагностическая чувствительность составляет 89%.

3.3. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется, как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матрице образца.

Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина).

3.4. Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с разными % авидности.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Авидность, %			Коэффициент вариации, %	Количество репликаторов
	Среднее значение	± Стандартное отклонение			
a	13.9	± 1.6		11.6	10
b	32	± 4		13.4	10
c	52	± 5		10.1	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Авидность, %			Коэффициент вариации, %	Количество постановок
	Среднее значение	± Стандартное отклонение			
a	23.9	± 2.9		12	10
b	42.5	± 4.7		11.1	10
c	75.6	± 8.8		11.6	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты набора разных серий (см. п.2.2.1). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующему неверному результату анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Дистиллированная вода.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липимичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1-2 суток. Для хранения в течение более длительного времени образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:300 с помощью приготовленного Раствора для разведения (см. п.2.2.2). Например: 10 мкл образца + 2990 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Составьте схему нанесения образцов на планшет. Отметьте по 2 лунки для: обнуления спектрофотометра (Blank), низкоавидного контроля, высокоавидного контроля и каждого из исследуемых образцов.

7.2. Внесите по 100 мкл Низкоавидного контроля в лунки C1 и D1; по 100 мкл Высокоавидного контроля в лунки E1 и F1; по 100 мкл предварительно разведенных образцов в дубликатах – во все остальные лунки.

7.3. Закройте планшет клейкой пленкой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **60±5 минут при 37±2°C**.

7.4. Удалите содержимое лунок и промойте лунки **4 раза**, внося при каждой промывке **по 350 мкл** разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.5. Внесите **по 100 мкл** Раствора для разведения в нечетные лунки (A1, C1, E1, G1 и т.д.) и **по 100 мкл** Реагента для диссоциации в четные лунки (B1, D1, F1, H1 и т.д.).

7.6. Закройте планшет клейкой пленкой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **60±5 минут при 37±2°C**.

7.7. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.4).

7.8. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Конъюгата.

7.9. Закройте планшет клейкой пленкой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **30±2 минут при 37±2°C**.

7.10. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п. 7.4).

7.11. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Раствора ТМБ.

7.12. Инкубируйте в течение **10 минут при 37±2°C**. Избегайте попадания света на планшет.

7.13. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией по эксплуатации.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 7.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить область кривой.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычитите среднее значение оптической плотности (ОП) лунок A1, B1 из значений ОП других лунок.

Убедитесь, что ОП каждого образца, инкубированного с Раствором для разведения образцов, > 0,300 ед.опт.плотн. Если это так, можно выполнять расчеты. Если ОП образца < 0,300 ед.опт.плотн., это свидетельствует, что образец не содержит достаточную концентрацию антител для определения avidности IgG (пациент либо не имеет иммунитета к инфекции вирусом токсоплазмы, либо находится в периоде, когда иммунный ответ еще не сформирован).

Для каждого образца и контроля рассчитайте процентное отношение ОП лунки, инкубированной с Реагентом для диссоциации и ОП лунки, инкубированной с Раствором для разведения.

ОП с Реагентом для диссоциации

_____ x 100 = % Авидности

ОП с Раствором для разведения

Если ОП образца при длине волны 450 нм >3,000 ед.опт.плотн. в любой из лунок, следует измерить ОП повторно при длине волны 405 нм. Процент avidности рассчитывается по формуле (см. выше) на основании ОП при 405 нм.

9.1. Пример расчета

Образец	ОП с Раств. для разведения	ОП с Reag. для диссоциации	% Авидности
Низкоавидный контроль	1.276	0.031	2.4%
Высокоавидный контроль	1.475	0.580	39.3%
Образец	0.766	0.127	16.6%

9.2. Критерии достоверности

ОП, измеренная при 450 нм, в лунках с высокоавидным и низкоавидным контролями, инкубированными с Раствором для разведения, должна быть > 0,500 ед.опт.плотн.

Процент avidности должен быть ниже 20% для низкоавидного контроля и выше 30% для высокоавидного контроля. В любом случае, результаты анализа должны подтверждаться клиническими наблюдениями и результатами других диагностических тестов.

9.3. Интерпретация результатов

% avidности > 30% =	IgG к Токсоплазме с высокой avidностью
% avidности 20-30% =	IgG к Токсоплазме со средней avidностью (т.н. «серая зона»)
% avidности < 20% =	IgG к Токсоплазме с низкой avidностью

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Наличие высокоавидных антител не исключает возможность недавнего инфицирования. Тем не менее, учитывая высокую специфичность данного анализа, положительный результат позволяет с высокой степенью достоверности предполагать, что инфицирование произошло в предшествующие 3 месяца.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:300

Лунки	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
Реагент								
Низкоавидный контроль CTR BA	----	----	100 мкл	100 мкл	----	----	----	----
Высокоавидный контроль CTR AA	----	----	----	----	100 мкл	100 мкл	----	----
Образец	----	----	----	----	----	----	100 мкл	100 мкл

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин
- Промывка: 4 x 350 мкл

Раствор для разведения образцов DIL	100 мкл	----	100 мкл	----	100 мкл	----	100 мкл	----
Реагент для диссоциации DISS	----	100 мкл	----	100 мкл	----	100 мкл	----	100 мкл

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: A: 37±2°C, 10 мин

Стоп реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание при длине волны 450-405 нм

Генеральный директор
ОО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ОО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia
 Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443
 National Order Entry: +39 06 91.249.702
 Export Department: +39 06 91.249.701
 Customer Care: +39 06 91.249.700
info@radim.it - www.radim.it



Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 7 (семь) листов

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев

**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
 ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М К *Toxoplasma gondii*
 В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
 Токсоплазма IgM**

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Toxoplasma gondii относится к простейшим. Это внутриклеточный паразит, способный инфицировать и человека, и животных. Окончательным хозяином являются кошки, в ЖКТ которых проходит фаза полового размножения *T. gondii*. Человек может инфицироваться при употреблении в пищу мяса, не прошедшего достаточную тепловую обработку или при прямом контакте с зараженным животным. В большинстве случаев у взрослых и подростков инфекция протекает субклинически или со слабо выраженными симптомами.

Приобретенная инфекция часто сопровождается лимфаденитами, повышением температуры, лимфоцитозом, миалгией. Хориоретиниты являются известным проявлением приобретенной инфекции, но также могут быть и результатом врожденного токсоплазмоза. Для ВИЧ-инфицированных пациентов частым проявлением токсоплазмоза является энцефалит. Наиболее уязвимыми для инфицирования являются пациенты с ослабленным иммунитетом и беременные женщины (воздействие на плод), особенно в первые 6 месяцев беременности. В течение этого периода у плода идет развитие ЦНС, поэтому инфицирование приводит к негативным последствиям, таким как хориоретиниты, церебральное кальцифицирование, психомоторные нарушения, гидроцефалия. Уровень определяемых антител у взрослых варьирует в зависимости от таких факторов, как возраст, географические условия, метод определения.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип действия данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА), вариант «capture». В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела класса IgM против токсоплазмы (если они есть в образце) улавливаются антителами против μ -цепей иммуноглобулинов М человека, адсорбированными на твердой фазе (в лунках планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение двух следующих инкубаций комплекс «антиген токсоплазмы - биотинилированные антитела» реагирует со связанными антителами IgM против токсоплазмы, далее стрептавидин, меченный пероксидазой хрена, взаимодействует с биотином. После цикла промывки в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением стоп-реагента (HCL). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание антител класса IgM в образцах и контролях прямо пропорционально измеренной оптической плотности в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Описание
Планшет MTP	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Conc.
Раствор для разведения DIL	1 x 100 мл	Готов к использованию Ready for use
Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Положительный контроль POS	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use

Cut-off контроль C/O	1 x 2,5 мл	Готов к использованию Ready for use
Антиген Ag	7 x 2,5 мл	Лиофилизирован
Конъюгат/биотин CONJ/BIO	1 x 19 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат HRPO CONJ	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 или на 192 лунки.

2.2.1. Специфические реагенты

- **Иммунсорбент – планшет (MPT) / (Coated microplates):** лунки стрипов планшета покрыты антителами против μ -цепей иммуноглобулинов человека. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).
- **Положительный контроль (POS) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgM к токсоплазме. Готов к использованию. Консервант: NaN_3 (<0.1%).
- **Cut-off контроль (C/O) / Cut-off Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgM к токсоплазме. Готов к использованию. Раствор голубого цвета. Консервант: NaN_3 (<0.1%).
- **Антиген токсоплазмы (Ag) / Toxoplasma antigen:** 7 флаконов, содержат инактивированный антиген токсоплазмы. Перед использованием восстановите содержимое каждого флакона, добавив 2,5 мл раствора конъюгат/биотин. Восстановленный реагент хранить не более 10 суток при температуре +2...8°C.
- **Конъюгат/биотин (CONJ|BIO) / Biotinylated Conjugate:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержит моноклональные антитела против токсоплазмы, конъюгированные с биотином. Готов к использованию. Консервант: неомицин.
- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержит стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRPO). Готов к использованию. Консервант: неомицин.

2.2.2. Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

- **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing Solution (concentrated):** 1 флакон. Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: тимеросал (< 0.05%). Перед использованием разведите необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C.
- **Раствор для разведения (DIL) / Sample Diluent:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Жидкость красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Готов к использованию.
- **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, не содержит антител класса IgM к токсоплазме. Готов к использованию. Раствор красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%).
- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H_2O_2 . Готов к использованию.
- **Стоп-реагент(STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе из 183 образцов, отрицательных по содержанию антител IgM класса против токсоплазмы. Специфичность составляет 98,2%.

3.2. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе из 124 образцов, полученных от пациентов, с острым токсоплазмозом. Чувствительность составляет 98,1%.

3.3. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матрике образца. Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина).

3.4. Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител класса IgM против токсоплазмы.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	$\pm$ Индекс	S.D.	C.V. %	Кол-во репликаторов
a	4,46	$\pm$	0,15	3,45	10
b	1,73	$\pm$	0,06	3,39	10
c	0,96	$\pm$	0,02	2,56	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	$\pm$ Индекс	S.D.	C.V. %	Кол-во постановок
a	1,72	$\pm$	0,18	10,40	10
b	5,41	$\pm$	0,51	9,48	10
c	1,40	$\pm$	0,10	6,99	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты набора разных серий (см. п.2.2.1). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте только дистиллированную воду или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующему неверному результату анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620,450 и 405нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. Для хранения в течение более длительного времени образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:100 Раствором для разведения (п.2.2.2).

Например: 10 мкл образца + 990 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.
- 7.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Контроли вносите в дубликатах, образцы - в монопликатах. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank).
- 7.2. Внесите по 100 мкл контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки.
Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.
- 7.3. Внесите 100 мкл Раствора для разведения в лунку для обнуления.
- 7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60 ± 5 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

7.5. Удалите содержимое лунок и промойте лунки **4 раза**, внося при каждой промывке **по 350 мкл** разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.6. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Антигена, восстановленного раствором конъюгат/биотин.

7.7. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **60±2 минут при 37±2°C**.

7.8. Удалите содержимое лунок промойте планшет (см. п.7.5).

7.9. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Конъюгата (стрептавидин-HRP) .

7.10. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **30±2 минут при 37±2°C**.

7.11. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.5).

7.12. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Раствора ТМБ.

7.13. Инкубируйте в течение **10 минут при 37±2°C** или **15 минут при комнатной температуре (+18...25°C)**. Избегайте попадания света на планшет.

7.14. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Стоп-реагента .

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определить оптическую плотность (ОП) отрицательного контроля, положительного контроля и cut-off контроля (пороговое значение). Присутствие или отсутствие антител класса IgM против *Toxoplasma gondii* определяется путем сравнения ОП образца с ОП Cut-off контроля.

Образцы с ОП ниже ОП Cut-off контроля признают нереактивными (не содержащими антитела класса IgM против *Toxoplasma gondii*).

Образцы с ОП выше ОП Cut-off контроля признают реактивными (содержащими антитела класса IgM против *Toxoplasma gondii*).

Область значений ОП ± 10% от ОП Cut-off контроля является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, требуется повторное тестирование для подтверждения.

9.1 Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям.

Описание	Условие
Отрицательный контроль	< 0,200
Положительный контроль	> 0,700

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.2 Интерпретация результатов

Результат определяется как отношение ОП образца к ОП Cut-off контроля. Эта величина называется индексом.

$$\text{Индекс} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП Cut-off контроля}}$$

– Образцы с Индексом < 0,9 признают отрицательными по содержанию антител IgM класса против токсоплазмы.

– Образцы с Индексом > 1,1 признают положительными по содержанию антител IgM класса против токсоплазмы.

– Образцы с Индексом 0,9 – 1,1 (ОП ± 10% от Cut-off контроля) считаются сомнительными и требуют повторного тестирования.

9.3 Пример подсчета

Нижеследующие данные приведены в качестве примера и не могут быть использованы как экспериментальные результаты.

Описание	ОП	IgM anti-Toxo	Индекс
----------	----	---------------	--------

	450 nm	
Отрицательный контроль	0,082	
Cut-off контроль	0,504	
Положительный контроль	1,992	
Образец	0,889	+ 1,76

Исследуемый образец признается положительным (+) по содержанию антител класса IgM против токсоплазмы.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

При определении уровня иммунитета пациента против *Toxoplasma gondii* присутствие антител класса IgG не исключает возможность текущей инфекции. Таким образом, определение специфических антител класса IgM является основным методом для ранней диагностики острой инфекции. В случае заболевания раннее вмешательство значительно уменьшает риск. Применение варианта «сартуре» ИФА позволяет значительно снизить возможность неспецифических реакций. Однако результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:100

Реагенты	Лунки	Blank	Контроли	Образцы
Отрицательный, положительный и cut-off контроли NEG POS C/O		-----	100 мкл	-----
Образцы		-----	-----	100 мкл
Раствор для разведения DIL		100 мкл	-----	-----

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор антигена в конъюгате с биотином Ag + CONJ BIO	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: вариант А: 37±2°C, 10 мин; вариант В: комнатная температура, 15 мин

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм.

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 4 (четыре) лист 06

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И/ИЛИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
 ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG ПРОТИВ ВИРУСА
 КРАСНУХИ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**
Краснуха IgG

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Вирус краснухи представляет собой РНК-содержащий вирус сферической формы, 60 нм в диаметре. Краснуха как заболевание обычно протекает в легкой форме, оставляя пациента иммунизированным к этому вирусу. Однако, когда первичное заражение происходит во время беременности, это может оказывать тератогенное влияние на плод, особенно в первый триместр беременности. Кардио-васкулярные нарушения, глухота, хориоретиниты, задержка роста и развития нервной системы могут быть следствием воздействия вируса на плод. Краснуха менее заразна, чем корь, поэтому значительное количество женщин репродуктивного возраста не успевают перенести эту болезнь к моменту беременности. Из них 10-20% не вакцинированы, а значит, восприимчивы к вирусу краснухи.

Диагноз «краснуха» может быть поставлен следующим образом:

- по увеличению количества антител класса IgG к вирусу краснухи в двух тестируемых образцах крови пациента, взятых с промежутком времени;
- выявлением антител класса IgM в образце крови.

Анализ с целью определения антител класса IgM к вирусу краснухи является наиболее распространенным методом для постановки диагноза в острой стадии заболевания.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип работы данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела класса IgG против вируса краснухи (если они есть в образце) связываются с антигеном вируса краснухи, адсорбированным на твердой фазе (в лунках планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение следующей инкубации антитела против IgG человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом антиген вируса краснухи – антитело. После цикла промывок в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание антител класса IgG в образцах и калибраторах прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество		Состояние
	1й вариант комплектации	2й вариант комплектации	
Планшет MTP	1 x 96 лунок	2 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	2 x 50 мл	Концентрат Conc.
Раствор для разведения DIL	1 x 20 мл	2 x 20 мл	Концентрат Conc.
Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Калибраторы CAL	1 x 2.5 мл 4 x 1.5 мл	1 x 2.5 мл 4 x 1.5 мл	Готов к использованию Ready for use

Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 или на 192 лунки.

2.2.1. Специфические реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MPT) / Coated microplates:** лунки стрипов планшета покрыты очищенным и инактивированным антигеном вируса краснухи. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

- **Калибраторы (CAL) / Calibrator:** растворы на основе сыворотки крови, содержат антитела класса IgG против вируса краснухи в следующих концентрациях: 15, 30, 60, 120 и 240 МЕ/мл. Готовы к использованию. Растворы калибраторов 30, 60, 120, 240 МЕ/мл красного цвета, раствор калибратора 15 МЕ/мл – голубого цвета. Консервант: NaN_3 (<0.1%). Калибраторы аттестованы по 2 Международному Стандарту ВОЗ 67/182, 1986.

- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержит мышинные моноклональные антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP). Готов к использованию. Раствор розового цвета. Консервант: неомицин.

2.2.2. Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

- **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing Solution (concentrated):** фосфатный буферный раствор, содержащий твин-20 и консервант Тимеросал (< 0.05%). Перед использованием разведите необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C.

- **Раствор для разведения 20x (DIL) / Sample Diluent (concentrated):** раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Жидкость красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Непосредственно перед употреблением разведите в отношении 1:20 подготовленным к использованию промывочным раствором (см. выше). Приготовленный раствор для разведения хранить не более 30 суток при +2...8°C.

- **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** раствор на основе сыворотки крови, не содержит антител класса IgG к вирусу краснухи. Готов к использованию. Раствор красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Может использоваться как:

- 1) Отрицательный контроль в качественном анализе.
- 2) Калибратор с концентрацией 0 МЕ/мл в количественном анализе.

- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. (Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H_2O_2 . Готов к использованию.

- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон . 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе более 100 образцов, полученных от пациентов, не имеющих иммунитета к вирусу краснухи. Специфичность составляет 97,2%.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе более 200 образцов, полученных от пациентов, перенесших в прошлом краснуху. Чувствительность составляет 100%.

3.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матриксе образца. Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина).

3.4 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выражается минимальным количеством определяемого аналита, выявляемым с помощью данного набора. Предел детекции составляет 0,4 МЕ/мл (99% доверительный интервал). Эта величина была определена как концентрация аналита, отличающаяся от нулевого калибратора на три стандартных отклонения.

3.5 Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител класса IgG против вируса краснухи.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	±	S.D.	C.V.	Кол-во репликатов
	(МЕ/мл)			%	
a	24.37	±	0.92	3.78	10
b	102.64	±	4.83	4.70	10
c	200.3	±	13.9	6.9	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	±	S.D.	C.V.	Кол-во постановок
	(МЕ/мл)			%	
a	32.10	±	3.83	11.90	10
b	94.26	±	12.33	13.10	10
c	163.47	±	22.47	13.70	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты разных серий набора (см. п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2.) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.

- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Используемый при этом протирачный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Мерные цилиндры.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

- Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.
- В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. При необходимости более длительного хранения образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:300 с помощью приготовленного Раствора для разведения (см. п.2.2.2.). Например: 10 мкл образца + 2990 мкл раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank).

7.2. Внесите по 100 мкл контролей или калибраторов и разведенных образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли и калибраторы готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Внесите 100 мкл приготовленного Раствора для разведения в лунку для обнуления.

7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60 ± 5 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

7.5. Удалите содержимое лунок, а затем промойте их 4 раза, внося при каждой промывке по 350 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.6. Внесите во все лунки по 100 мкл Конъюгата.

7.7. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 30 ± 2 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

7.8. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.5).

7.9. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.

7.10. Инкубируйте в течение 10 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$ или 15 минут при комнатной температуре ($+18...+25^\circ\text{C}$). Избегайте попадания света на планшет.

7.11. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить область кривой.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Качественный анализ

Определить оптическую плотность (ОП) Отрицательного Контроля и Cut-off калибратора (15 МЕ/мл: пороговое значение). Присутствие или отсутствие антител класса IgG против вируса краснухи определяется путем сравнения ОП образца с ОП Cut-off калибратора.

Образцы с ОП ниже ОП Cut-off признают не реактивными (не содержащими антитела класса IgG против вируса краснухи).

Образцы с ОП выше ОП Cut-off признают реактивными (содержащими антитела класса IgG против вируса краснухи).

Область значений ОП $\pm 10\%$ от ОП калибратора является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требует повторного тестирования для подтверждения.

9.2 Количественный анализ

Отрицательный контроль является первой точкой калибровочной кривой (0 МЕ/мл антител класса IgG против вируса краснухи).

Калибровочная кривая строится в линейных координатах, где по оси X откладывают концентрации каждого калибратора, а по оси Y – ОП каждого калибратора. Соответствующие концентрации исследуемых образцов (МЕ/мл) получаются путем интерполяции ОП образца на калибровочной кривой.

Образцы с концентрацией IgG антител менее 15 МЕ/мл признают не реактивными.

Образцы с концентрацией IgG антител более 30 МЕ/мл признают реактивными.

Образцы с концентрацией IgG антител в диапазоне от 15 до 30 МЕ/мл признают сомнительными и требуют повторного тестирования для подтверждения.

Определение концентрации образцов

Например:

Описание	ОП 450 nm	Концентрация антител IgG против вируса краснухи	ОП 405 nm
Калибратор 0 МЕ/мл	0.015		0.005
Калибратор 15 МЕ/мл	0.309		0.103
Калибратор 30 МЕ/мл	0.591		0.330
Калибратор 60 МЕ/мл	1.280		0.426
Калибратор 120 МЕ/мл	2.170		0.723
Калибратор 240 МЕ/мл	2.898		0.966
Образец	1.280	59 МЕ/мл	0.426

Внимание: Отрицательный контроль = Калибратор 0 МЕ/мл

Путем интерполяции на калибровочной кривой полученная концентрация антител класса IgG против вируса краснухи составляет 59 МЕ/мл.

Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям.

Описание	Условие
Отрицательный контроль	< 0.200
ОП Кал 240 МЕ/мл / ОП Кал 15 МЕ/мл	> 7.8
ОП Кал 15 МЕ/мл / ОП Кал 0 МЕ/мл	> 13.8

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.3. Интерпретация результатов

– Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию антител IgG класса против вируса краснухи.

– Реактивные и сомнительные образцы признают положительными по содержанию антител IgG класса против вируса краснухи.

Образцы сыворотки крови, полученные от одного пациента с промежутком времени, должны сравниваться только при исследовании в одном и том же анализе. В этом случае 60% увеличение ОП во втором образце является значимым признаком недавней или развивающейся инфекции. В этом случае образцы тестируются на присутствие специфических IgM.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Хранить при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Наличие антител класса IgG к вирусу краснухи в любых концентрациях не исключает текущей инфекции. Таким образом, определение специфических антител класса IgM является основным методом для ранней диагностики острой инфекции. В случае заболевания раннее вмешательство значительно уменьшает риск. Однако результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:300

Реагенты	Лунки	Blank	Калибраторы и контроли	Образцы
Калибраторы и контроли	NEG CAL	-----	100 мкл	-----
Образцы		-----	-----	100 мкл
Раствор для разведения	DIL	100 мкл	-----	-----

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат	CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------	------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл

Раствор ТМБ	TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------	-----	---------	---------	---------

- Инкубация: вариант А: 37±2°C, 10 мин; вариант В: комнатная температура 15 мин.

Стоп-реагент	STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------	------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм.

еральный директор
ОО «Компания Алкор Био»

ководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ОО «Компания Алкор Био»



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 7 (смв) листов

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



«УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 11 » _____ 2011г



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АВИДНОСТИ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG ПРОТИВ ВИРУСА КРАСНУХИ
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
Краснуха IgG-авидность**

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Вirus краснухи представляет собой РНК-содержащий вирус сферической формы, 60 нм в диаметре. Краснуха как заболевание обычно протекает в легкой форме, оставляя пациента иммунизированным к этому вирусу. Однако, когда первичное заражение происходит во время беременности, особенно в первый триместр, это может оказывать тератогенное влияние на плод. Следствием воздействия вируса на плод могут быть кардио-васкулярные нарушения, глухота, хориоретиниты, задержка роста и развития нервной системы.

Краснуха менее заразна, чем корь, поэтому значительное количество женщин репродуктивного возраста не успевает перенести эту болезнь к моменту беременности. Из них 10-20% не вакцинированы, а значит, восприимчивы к вирусу краснухи. По этой причине диагностика острой формы краснухи у беременных женщин особенно важна. Обычно для этой цели проводят определение IgM. Так как IgM персистируют (часто длительно) либо присутствуют в случаях бессимптомного течения инфекции (которое не представляет опасности для плода), то выявить острую фазу заболевания путем исследования только одного образца крови, взятого у пациента, может быть достаточно сложно. Для выявления первичной инфекции особенно полезным оказывается определение авидности специфических IgG. Первичный иммунный ответ на инфекцию характеризуется IgG-антителами с низкой авидностью, которые связываются со специфическим антигенным сайтом, но легко диссоциируют.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип работы данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА), в котором сыворотки пациентов, внесенные в лунки микропланшета в дубликатах, реагируют с антигеном вируса краснухи, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок. После первой инкубации планшет промывают, а парные лунки инкубируют с разными буферными растворами, один из которых содержит мочевины. Мочевина вызывает диссоциацию ранее образовавшегося комплекса антиген вируса краснухи - антитело. Степень диссоциации зависит от авидности антител.

После следующего цикла промывки комплекс «антиген вируса краснухи-антитело» вступают в реакцию с антителами против IgG человека, мечеными пероксидазой хрена, которая, в свою очередь, реагирует с раствором ТМБ. Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Процент авидности вычисляют как отношение между оптическими плотностями в парных лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет MTP	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Concentrate
Раствор для разведения образцов DIL	1 x 20 мл	Концентрат Concentrate
Контроль Низкоавидный CTR BA	1 x 2 мл	Лиофилизирован Lyophilized
Контроль Высокоавидный CTR AA	1 x 2 мл	Лиофилизирован Lyophilized
Реагент для диссоциации	1 x 10 мл	Готов к использованию

DISS		Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Специфические реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplate:** Планшет из 12 стрипов по 8 лунок: внутренняя поверхность лунок покрыта очищенным и инактивированным антигеном вируса краснухи. Оставшиеся неиспользованными стрипы поместить в пластиковый пакет (прилагается) и плотно закрыть; хранить при температуре +2...8°C.

- **Низкоавидный контроль (CTR BA) / Low avidity control:** 1 флакон. Лиофилизированный препарат красного цвета. Изготовлен на основе сыворотки крови, содержащей низкоавидные IgG человека к вирусу краснухи. Консервант: NaN_3 (<0.1%). Перед использованием восстановите содержимое флакона в 2 мл дистиллированной воды. Восстановленный реагент хранить более 2 месяцев при температуре +2...8°C. Для длительного хранения - заморозить при -20°C.

- **Высокоавидный контроль (CTR AA) / High avidity control:** 1 флакон. Лиофилизированный препарат синего цвета. Изготовлен на основе сыворотки крови, содержит высокоавидные человеческие IgG к вирусу краснухи. Консервант: NaN_3 (<0.1%). Перед использованием восстановите содержимое флакона в 2 мл дистиллированной воды. Восстановленный реагент хранить более 2 месяцев при температуре +2...8°C. Для длительного хранения - заморозить при -20°C.

- **Реагент для диссоциации (DISS) / Dissociating reagent:** 1 флакон (10 мл). Содержит буферный раствор с мочевиной. Готов к использованию.

- **Конъюгат (CONJ) / Conjugate:** 1 флакон (14 мл). Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержащий мышинные моноклональные антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO). Готов к использованию. Раствор розового цвета. Консервант: неомицин.

2.2.2. Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

- **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing Solution (concentrated):** 1 флакон (50 мл). Содержит фосфатный буферный раствор и Твин 20. Консервант: тимеросал (<0.05%). Перед использованием разведите необходимое количество концентрата в соотношении 1:20 дистиллированной водой. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить 30 суток при +2...8°C.

- **Раствор для разведения образцов 20x (DIL) / Sample Diluent (concentrated):** 1 флакон (20 мл). Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Жидкость красного цвета. Консервант: NaN_3 (<0.1%). Непосредственно перед применением разведите концентрат в соотношении 1:20 подготовленным к использованию промывочным раствором (см. выше). Приготовленный раствор для разведения хранить 30 суток при +2...8°C.

- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон (14 мл). Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H_2O_2 . Готов к использованию.

- **Стоп реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон (14 мл). 1N HCl. Готов к использованию.

- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**

- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность

Диагностическую специфичность данного метода оценивали на группе из 100 образцов от пациентов с перенесенной ранее или повторной инфекцией. Диагностическая специфичность составляет 100%.

3.2. Диагностическая чувствительность

Диагностическую чувствительность данного метода оценивали на группе из 56 образцов с первичной инфекцией. Диагностическая чувствительность составляет 87,8%.

3.3. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется, как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матрице образца. Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (ЭДТА и гепарин).

3.4. Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициент вариации) на трех сыворотках с разными % авидности.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Авидность, %			Коэффициент вариации, %	Количество репликатов
	Среднее значение	±	Стандартное отклонение		
a	96	±	2	2.5	10
b	72	±	4	5.2	10
c	17.1	±	1.3	7.5	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Авидность, %			C.V. %	Количество постановок
	Среднее значение	±	Стандартное отклонение		
a	95.5	±	4.7	4.9	10
b	74.9	±	9.94	13.36	10
c	17.53	±	2.17	12.36	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты набора разных серий (см. п.2.2.1). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на то что были получены отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5.1. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Ручная постановка

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированный цилиндр для разведения реагентов.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Дистиллированная или деионизованная вода.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC. В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы могут изменять результаты анализа. Присутствие фибрина также может оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Храните образцы при температуре $+2...+8^\circ\text{C}$ в течение 1-2 дней. При необходимости хранения в течение более длительного времени образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в отношении 1:300 с помощью приготовленного Раствора для разведения (см. п.2.2.2). Например: 10 мкл образца + 2990 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...+25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Составьте схему нанесения образцов на планшет. Отметьте по 2 лунки для: обнуления спектрофотометра (Blank), низкоавидного контроля, высокоавидного контроля и каждого из образцов.

7.2. Внесите по 100 мкл Низкоавидного контроля в лунки C1 и D1; по 100 мкл Высокоавидного контроля в лунки E1 и F1; по 100 мкл предварительно разведенных образцов в дубликатах – во все остальные лунки.

7.3. Закройте планшет клейкой пленкой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60 ± 5 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

7.4. Удалите содержимое лунок и промойте лунки **4 раза**, внося при каждой промывке **по 350 мкл** предварительно разведенного Промывочного раствора в каждую лунку. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.5. Внесите **по 100 мкл** Раствора для разведения в нечетные лунки (A1, C1, E1, G1 и т.д.) и **по 100 мкл** Реагента для диссоциации в четные лунки (B1, D1, F1, H1 и т. д.).

7.6. Закройте планшет клейкой пленкой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **30±2 минут при 37±2°C**.

7.7. Удалите содержимое лунок. Промойте планшет (см. п. 7.4).

7.8. Внесите **по 100 мкл** Конъюгата в каждую лунку

7.9. Закройте планшет клейкой пленкой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **30±2 минут при 37±2°C**.

7.10. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.4).

7.11. Внесите **по 100 мкл** Раствора ТМБ во все лунки.

7.12. Инкубируйте в течение **10 минут при 37±2°C**. Избегайте попадания света на планшет.

7.13. Внесите **по 100 мкл** Стоп реагента во все лунки.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с инструкцией по эксплуатации анализатора.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить область кривой.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычитите среднее значение оптической плотности (ОП) лунок A1, B1 из значений ОП других лунок.

Убедитесь, что ОП каждого образца, инкубированного с Раствором для разведения образцов, > 0,300. Если это так, можно выполнить расчеты. Если ОП образца < 0,300, это свидетельствует, что образец не содержит достаточную концентрацию антител для определения авидности IgG (пациент либо не имеет иммунитета к инфекции вирусом краснухи, либо находится в периоде, когда иммунный ответ еще не сформирован).

Для каждого образца и контроля рассчитайте процентное отношение ОП лунки, инкубированной с Реагентом для диссоциации и ОП лунки, инкубированной с Раствором для разведения.

$$\frac{\text{ОП с Реагентом для диссоциации}}{\text{ОП с Раствором для разведения}} \times 100 = \% \text{ Авидности}$$

Если ОП образца при длине волны 450 нм > 3,000 в любой из лунок, следует измерить ОП повторно при длине волны 405 нм. Процент авидности рассчитывается по формуле (см выше) на основании ОП при 405 нм.

9.2. Пример расчета

Образец	ОП с Раств. для разведения	ОП с Реаг. для диссоциации	% Авидности
Низкоавидный контроль	0.953	0.086	9.0
Высокоавидный контроль	1.470	1.256	85.4
Образец	0.610	0.105	17.2

9.3. Критерии достоверности

ОП, измеренная при 450 нм, в лунках с высокоавидным и низкоавидным контролями, инкубированными с Раствором для разведения, должна быть > 0,400

Процент авидности должен быть ниже 50% для Низкоавидного контроля и выше 60% для Высокоавидного контроля. В любом случае, результаты анализа должны подтверждаться клиническими наблюдениями и результатами других диагностических тестов.

9.4. Интерпретация результатов

% авидности > 60% =	IgG к вирусу краснухи с высокой авидностью
% авидности 50-60% =	IgG к вирусу краснухи со средней авидностью (т.е. «серая зона»)
% авидности < 50% =	IgG к вирусу краснухи с низкой авидностью

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Хранить при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Наличие высокоавидных антител не исключает возможность недавнего инфицирования. Тем не менее, учитывая высокую специфичность данного анализа, положительный результат позволяет с высокой степенью достоверности предполагать, что инфицирование произошло в предшествующие 3 месяца.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:300

Лунки	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
Реагент								
Низкоавидный контроль CTR BA	----	----	100 мкл	100 мкл	----	----	----	----
Высокоавидный контроль CTR AA	----	----	----	----	100 мкл	100 мкл	----	----
Образец	----	----	----	----	----	----	100 мкл	100 мкл

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин
- Промывка: 4 x 350 мкл

Раствор для разведения DIL	100 мкл	----	100 мкл	----	100 мкл	----	100 мкл	----
Реагент для диссоциации DISS	----	100 мкл	----	100 мкл	----	100 мкл	----	100 мкл

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: А: 37±2°C, 10 мин.

Стоп реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание при длине волны 450 и 405 нм.

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»

Сусорова А.С.

RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 7 ("Компания Алкор Био") листов 6

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев

«УТВЕРЖДАЮ»

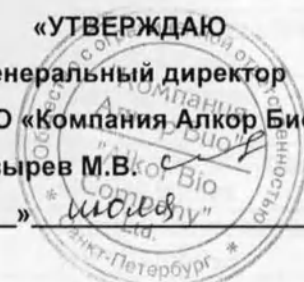
Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 12 »

2011г



НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М К ВИРУСУ КРАСНУХИ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА Краснуха IgM

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Вирус краснухи представляет собой РНК-содержащий вирус сферической формы, 60 нм в диаметре, принадлежит к семейству *Togaviridae*. Заболевание, вызванное вирусом краснухи, обычно протекает в легкой форме, оставляя пациента иммунизированным к этому вирусу. Однако, когда первичное заражение происходит во время беременности, это может оказывать тератогенное влияние на плод, особенно в первый триместр беременности. Кардио-васкулярные нарушения, глухота, хориоретиниты, задержка роста и развития нервной системы могут быть следствием воздействия вируса на плод. Краснуха менее заразна, чем корь, поэтому значительное количество женщин репродуктивного возраста не успевают перенести эту болезнь к моменту беременности. Из них 10-20% не вакцинированы, следовательно, восприимчивы к вирусу краснухи.

Диагноз «краснуха» может быть поставлен следующим образом:

- по увеличению количества антител класса IgG к вирусу краснухи в двух тестируемых образцах крови пациента, взятых с промежутком времени;
- определением присутствия антител класса IgM в образце крови.

Анализ с целью определения антител класса IgM к вирусу краснухи является наиболее распространенным методом для постановки диагноза в острой стадии заболевания.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип работы данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА), вариант «capture». В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела класса IgM против вируса краснухи (если они есть в образце) улавливаются антителами против μ -цепей иммуноглобулинов М человека, адсорбированными на твердой фазе (в лунках планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение двух следующих инкубаций комплекс «антиген вируса краснухи - биотинилированные антитела» сначала реагирует со связанными антителами IgM против вируса краснухи, а стрептавидин, меченный пероксидазой хрена, взаимодействует с биотином. После цикла промывок в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание антител класса IgM в образцах и контролях прямо пропорционально измеренной оптической плотности в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет MTP	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Конс.
Раствор для разведения DIL	1 x 100 мл	Готов к использованию Ready for use
Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Положительный контроль POS	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use

Cut-off контроль C/O	1 x 2,5 мл	Готов к использованию Ready for use
Антиген Ag	7 x 2,5 мл	Лиюфилизирован
Конъюгат/биотин CONJ/BIO	1 x 19 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат HRPO CONJ	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп- реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Специфические реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplates:** лунки стрипов планшета покрыты антителами против μ -цепей иммуноглобулинов М человека. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).
- **Положительный контроль (POS) / Positive Control:** 1 флакон (2 мл). Раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgM к вирусу краснухи. Готов к использованию. Консервант: NaN_3 (< 0,1%).
- **Cut-off контроль (C/O) / Cut-off Control:** 1 флакон (2,5 мл). Раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgM к вирусу краснухи. Готов к использованию. Раствор голубого цвета. Консервант: NaN_3 (< 0,1%).
- **Антиген вируса краснухи (Ag) / Rubella antigen:** 7 флаконов, содержат инактивированный антиген вируса краснухи. Перед использованием восстановите содержимое каждого флакона с помощью 2,5 мл раствора конъюгат/биотин. Хранить восстановленный реагент не более 5 суток при +2...8°C или 1 месяц замороженным при -20°C. Не допускается повторное замораживание.
- **Конъюгат/биотин (CONJ/BIO) / Biotinylated Conjugate:** 1 флакон (19 мл). Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержащий моноклональные антитела против вируса краснухи, конъюгированные с биотином. Готов к использованию. Консервант: неомицин.
- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон (14 мл). Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержащий стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRPO). Готов к использованию. Консервант: неомицин.

2.2.2. Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

- **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing Solution (concentrated):** 1 флакон (50 мл). Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: Тимеросал (< 0,05%). Перед использованием разведите необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C.
- **Раствор для разведения (DIL) / Sample Diluent:** 1 флакон (100 мл). Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Жидкость красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0,1%). Готов к использованию.
- **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** 1 флакон (2 мл). Раствор на основе сыворотки крови, не содержит антител класса IgM к вирусу краснухи. Готов к использованию. Раствор красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0,1%).
- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон (14 мл). Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H_2O_2 . Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон (14 мл). 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе из 253 образцов, отрицательных по содержанию антител IgM класса против вируса краснухи. Специфичность составляет 100%.

3.2. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе из 112 образцов, полученных от пациентов с острой краснушной инфекцией. Чувствительность составляет 96,4%.

3.3. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матриксе образца. Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина).

3.4. Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициент вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител класса IgM против вируса краснухи.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение Индекс	±	S.D.	C.V. %	Кол-во репликатов
a	0,95	±	0,06	6,2	10
b	2,98	±	0,13	4,25	10
c	5,97	±	0,19	3,26	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение Индекс	±	S.D.	C.V. %	Кол-во постановок
a	6,80	±	0,65	9,50	10
b	4,71	±	0,44	9,33	10
c	1,47	±	0,21	14,03	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты набора разных серий (см. п.2.2.1). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неверным результатам анализа.

– Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.

– Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.

– Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

– При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.

– Не разрешается пипетировать ртом.

– Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

– Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

– Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

– Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

– Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

– Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки).

– Градуированные цилиндры для разведения реагентов.

– Дистиллированная вода.

– Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

– Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

– Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

– Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

– В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...+8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. Для хранения в течение более длительного времени образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:100 Раствором для разведения (см. п. 2.2.2.). Например: 10 мкл образца + 990 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры (+18...25°C).

– Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Контроли вносятся в дубликатах, образцы - в монопликатах. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank).

7.2. Внесите по 100 мкл Контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения

7.3. Внесите 100 мкл Раствора для разведения в лунку для обнуления.

7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60±5 минут при 37±2°C.

7.5. Удалите содержимое лунок и промойте их 4 раза, внося при каждой промывке по 350 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.6. Внесите во все лунки по 100 мкл Антигена, восстановленного раствором Конъюгат/биотин.

7.7. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60±5 минут при 37±2°C.

7.8. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п. 7.5).

7.9. Внесите по 100 мкл Конъюгата (стрептавидин-HRP) во все лунки.

7.10. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 30±2 минут при 37±2°C.

7.11. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п. 7.5).

7.12. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.

7.13. Инкубируйте в течение 10 минут при 37±2°C или 15 минут при комнатной температуре (+18...25°C). Избегайте попадания света на планшет.

7.14. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить область кривой.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ *

Определить оптическую плотность (ОП) отрицательного контроля, положительного контроля и Cut-off контроля (пороговое значение). Присутствие или отсутствие антител класса IgM против вируса краснухи определяется путем сравнения ОП образца с ОП Cut-off контроля (пороговое значение).

Образцы с ОП ниже ОП Cut-off контроля признают не реактивными (не содержащими антитела класса IgM против вируса краснухи).

Образцы с ОП выше ОП Cut-off контроля признают реактивными (содержащими антитела класса IgM против вируса краснухи).

Область значений ОП ± 10% от ОП Cut-off контроля является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требует повторного тестирования для подтверждения.

9.1. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

Описание	Условие
Отрицательный контроль	< 0,200
Положительный контроль	> 0,700

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.2. Интерпретация результатов

Результат определяется как отношение ОП образца к ОП Cut-off контроля. Эта величина называется индексом.

$$\text{Индекс} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП Cut-off контроля}}$$

- Образцы с Индексом < 0,9 признают отрицательными по содержанию антител класса IgM против вируса краснухи.
- Образцы с Индексом > 1,1 признают положительными по содержанию антител класса IgM против вируса краснухи.
- Образцы с Индексом 0,9 – 1,1 (ОП $\pm$ 10% от Cut-off контроля) считаются сомнительными и требуют повторного тестирования.

9.3. Пример подсчета

Нижеследующие данные приведены в качестве примера и не могут быть использованы как экспериментальные результаты.

Описание	ОП 450 nm	IgM anti-Rubella	Индекс
Отрицательный контроль	0,082		
Cut-off контроль	0,600		
Положительный контроль	2,500		
Образец	0,889	+	1,48

Исследуемый образец признается положительным (+) по содержанию антител класса IgM против вируса краснухи.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Наличие антител класса IgG к вирусу краснухи в любых концентрациях не исключает текущей инфекции. Таким образом, определение специфических антител класса IgM является основным методом для ранней диагностики острой инфекции. В случае заболевания раннее вмешательство значительно уменьшает риск. Применение варианта «capture» ИФА позволяет значительно снизить возможность неспецифических реакций. Однако результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:100

Реагенты	Лунки	Blank	Контроли	Образцы
Отрицательный, положительный и cut-off контроли NEG POS C/O		-----	100 мкл	-----
Образцы		-----	-----	100 мкл
Раствор для разведения DIL		100 мкл	-----	-----

- Инкубация: 37 $\pm$ 2°C, 60 $\pm$ 5 мин
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор антигена в конъюгате с биотином Ag + CONJ BIO	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--	---------	---------	---------

- Инкубация: 37 $\pm$ 2°C, 60 $\pm$ 5 мин
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат с HRPO CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37 $\pm$ 2°C, 30 $\pm$ 2 мин
- Промывка: 4 x 350 мкл

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: вариант А: 37±2°C, 10 мин; вариант В: комнатная температура, 15 мин

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------

- Считывание: 450-405 нм.

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia
Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443
National Order Entry: +39 06 91.249.702
Export Department: +39 06 91.249.701
Customer Care: +39 06 91.249.700
info@radim.it - www.radim.it



Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 7 (семь) лист 06

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 12 » _____ 2011г



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО
И/ИЛИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ КЛАССА IgG ПРОТИВ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
ЦМВ IgG**

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Цитомегаловирус (ЦМВ) представляет собой вирус икосаэдрической формы, 180–250нм в диаметре, принадлежит к семейству герпесвирусов. Вирус оказывает цитопатический эффект, увеличивая размеры клетки-хозяина за счет цитоплазматических и ядерных включений.

В настоящее время ЦМВ признан основным биологическим агентом, который приводит к врожденным аномалиям вследствие внутриутробной инфекции. Около 2% беременных женщин подвергаются первичной инфекции или реинфекции. 10–20% новорожденных детей с врожденной ЦМВ-инфекцией имеют выраженные признаки нарушения центральной нервной системы.

Врожденная инфекция также может быть следствием эндогенной реактивации вируса в организме беременной женщины. В последнее время ЦМВ определяют как основную причину осложнений при трансплантации органов, особенно при трансплантации почки. Процент ЦМВ инфекции как следствие трансплантации от ЦМВ-положительного донора ЦМВ-негативному реципиенту составляет от 52 до 100%. ЦМВ инфекция широко распространена: антитела к ЦМВ были обнаружены у 50-70% населения старше 35 лет. Кроме того, ЦМВ может быть изолирован из эпителия шейки матки 10% здоровых женщин. Обычно ЦМВ инфекция протекает бессимптомно. В результате первичной ЦМВ инфекции антитела класса IgG против ЦМВ сохраняются у иммунокомпетентных пациентов на период от 2 до 9 месяцев; у пациентов с нарушениями иммунной системы эти антитела могут сохраняться более 2 лет.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип действия данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела класса IgG против ЦМВ (если они есть в образце) связываются с антигеном ЦМВ, адсорбированным на твердой фазе (в лунках планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение следующей инкубации антитела против IgG человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом антиген ЦМВ–антитело. После цикла промывок в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание антител класса IgG в образцах и калибраторах прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество		Состояние
	1й вариант комплектации	2й вариант комплектации	
Планшет MTP	1 x 96 лунок	2 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	2 x 50 мл	Концентрат Conc.
Раствор для разведения DIL	1 x 20 мл	2 x 20 мл	Концентрат Conc.
Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use

Калибраторы CAL	1 x 2.5 мл 4 x 1.5 мл	1 x 2.5 мл 4 x 1.5 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок или на 192 лунки

2.2.1 Специфические реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (МТР) / Coated Microplates:** лунки стрипов планшета покрыты очищенным и инактивированным антигеном ЦМВ. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

- **Калибраторы (CAL) / Calibrators:** растворы на основе сыворотки крови, содержат антитела класса IgG против ЦМВ в следующих концентрациях: 10, 30, 60, 120 и 240 ОЕ/мл. Готовы к использованию. Растворы калибраторов 30, 60, 120, 240 ОЕ/мл красного цвета, раствор калибратора 10 ОЕ/мл – голубого. Консервант: NaN_3 (<0.1%). Калибраторы аттестованы по Международному Стандарту Института Пауля Эрлиха (International Standard PEI) 10/2001.

(1ОЕ анти-ЦМВ IgG = 0.141 ME).

- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** мышинные моноклональные антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), в матриксе на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Готов к использованию. Раствор розового цвета. Консервант: неомидин.

2.2.2 Общие реагенты для тест-систем «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

- **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing Solution (concentrated):** фосфатный буферный раствор, содержащий твин-20. Консервант: тимеросал (< 0.05%). Перед использованием разведите необходимое количество концентрата в соотношении 1:20 дистиллированной водой. При наличии в концентрате промывочного раствора кристаллов, поместите его в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор можно хранить 30 суток при +2...8°C.

- **Раствор для разведения 20x(DIL) / Sample Diluent (concentrated):** раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Жидкость красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Непосредственно перед применением разведите в соотношении 1:20 подготовленным к использованию промывочным раствором (см. выше). Приготовленный раствор для разведения можно хранить 30 суток при +2...8°C.

- **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** раствор на основе сыворотки крови, не содержит антител класса IgG к ЦМВ. Готов к использованию. Раствор красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Может использоваться как:

- 1) отрицательный контроль в качественном анализе;
- 2) калибратор с концентрацией 0 ОЕ/мл в количественном анализе.

- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H_2O_2 . Готов к использованию.

- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе из 150 образцов, полученных от пациентов, не имеющих антител к ЦМВ. Специфичность составляет 97,5%.

3.2. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе из 246 образцов, полученных от пациентов, перенесших в прошлом цитомегаловирусную инфекцию. Чувствительность составляет 98,7%.

3.3. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матриксе образца. Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (цитрат, соли ЭДТА и гепарина).

3.4. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выражается минимальным количеством определяемого аналита, достоверно выявляемым с помощью данного набора. Предел детекции составляет 0,7

ОЕ/мл (99% доверительный интервал). Эта величина была определена как концентрация аналита, отличающаяся от нулевого калибратора на три стандартных отклонения.

3.5. Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител класса IgG против ЦМВ.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	± (ОЕ/мл)	S.D.	C.V. %	Кол-во репликаторов
a	112.17	±	11.48	10.24	10
b	69.38	±	3.24	4.67	10
c	22.2	±	1.13	5.1	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	± (ОЕ/мл)	S.D.	C.V. %	Кол-во постановок
a	232.50	±	13.20	5.70	10
b	91.85	±	8.67	9.43	10
c	26.22	±	1.74	6.64	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты наборов разных серий (см. п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Отбирайте только то количество реагента, которое необходимо для анализа. Во избежание контаминации не возвращайте отобранный реагент обратно во флакон.
- Используйте дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной классификации образцов.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующему неверному результату анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Искользованный при этом протирачный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированный цилиндр для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 единиц оптической плотности при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

- Миллиметровая бумага.

5.2 Автоматическое проведение анализа

- Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC;
- В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Умеренная липемичность образцов не влияет на результаты анализа. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. Для хранения в течение более длительного времени образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:300 с помощью приготовленного Раствора для разведения (см. п.2.2.2.). Например: 10 мкл образца + 2990 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей или калибраторов и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank).

7.2. Внесите по 100 мкл контролей или калибраторов и разведенных образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли и калибраторы готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Внесите 100 мкл приготовленного Раствора для разведения в лунку для обнуления.

7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **60±5 минут при 37±2°C**.

7.5. Удалите содержимое лунок и промойте планшет **4 раза**, внося при каждой промывке по **350 мкл** разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.6. Внесите во все лунки по **100 мкл** Конъюгата.

7.7. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **30±2 минут при 37±2°C**.

7.8. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.5).

7.9. Внесите во все лунки по **100 мкл** Раствора ТМБ.

7.10. Инкубируйте в течение **10 минут при 37±2°C** или **15 минут при комнатной температуре (18-25°C)**. Избегайте попадания света на планшет.

7.11. Внесите во все лунки по **100 мкл** Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM или/и SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить область кривой.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Качественный анализ

Следует определить оптическую плотность (ОП) отрицательного контроля и калибратора Cut-off (10 ОЕ/мл: пороговое значение). Присутствие или отсутствие антител класса IgG против ЦМВ определяется путем сравнения ОП образца с ОП калибратора Cut-off.

Образцы с ОП ниже ОП 10 ОЕ/мл калибратора Cut-off признают нереактивными (не содержащими антитела класса IgG против ЦМВ).

Образцы с ОП выше ОП калибратора Cut-off признают реактивными (содержащими антитела класса IgG против ЦМВ).

Область значений ОП ± 10% от ОП калибратора Cut-off является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, требуется повторное тестирование для подтверждения.

9.2. Количественный анализ

Отрицательный контроль является первой точкой калибровочной кривой (0 ОЕ/мл антител класса IgG против ЦМВ).

Калибровочная кривая строится в линейных координатах, где по оси X откладывают концентрацию каждого калибратора, а по оси Y – ОП каждого калибратора. Соответствующие концентрации исследуемых образцов (ОЕ/мл) получаются путем интерполяции ОП образца на калибровочной кривой.

Образцы с концентрацией IgG антител менее 10 ОЕ/мл признают нереактивными.

Образцы с концентрацией IgG антител более 30 ОЕ/мл признают реактивными.

Образцы с концентрацией IgG антител в диапазоне от 10 до 30 ОЕ/мл признают сомнительными и требуют повторного тестирования для подтверждения.

Определение концентрации образцов

Например:

Описание	ОП 450 nm	Концентрация антител IgG против ЦМВ	ОП 405 nm
Калибратор 0 ОЕ/мл	0.080		0.027
Калибратор 10 ОЕ/мл	0.190		0.060
Калибратор 30 ОЕ/мл	0.463		0.154
Калибратор 60 ОЕ/мл	1.494		0.498
Калибратор 120 ОЕ/мл	2.251		0.750
Калибратор 240 ОЕ/мл	2.800		0.930
Образец	1.794	80 ОЕ/мл	0.590

Внимание: Отрицательный контроль = Калибратор 0 ОЕ/мл

Путем интерполяции на калибровочной кривой полученная в образце концентрация антител класса IgG против ЦМВ составляет 80 ОЕ/мл.

Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям.

Описание	Условие
Отрицательный контроль	< 0.200
ОП Кал 240 ОЕ/мл / ОП Кал 10 ОЕ/мл	> 7,13
ОП Кал 10 ОЕ/мл / ОП Кал 0 ОЕ/мл	> 3,3

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

Интерпретация результатов

– Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию антител IgG класса против ЦМВ.

– Реактивные и сомнительные образцы признают положительными по содержанию антител IgG класса против ЦМВ.

Образцы сыворотки крови, полученные от одного пациента с промежутком времени, должны сравниваться только при исследовании в одном и том же анализе. В этом случае 60% увеличение ОП во втором образце является значимым признаком недавней или развивающейся инфекции. В этом случае образцы тестируются на присутствие специфических IgM.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор хранить при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

При определении уровня иммунитета пациента против ЦМВ присутствие антител класса IgG, в любой концентрации, не исключает возможности наличия инфекции. Поэтому определение специфических антител класса IgM необходимо для ранней диагностики острой инфекции. В случае заболевания раннее вмешательство значительно уменьшает риск. Однако результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:300

Реагенты	Лунки	Blank	Отрицательный контроль, Калибратор	Образцы
Отрицательный контроль NEG		-----	100 мкл	-----
Калибраторы CAL		-----		
Образцы		-----	-----	100 мкл
Раствор для разведения DIL		100 мкл	-----	-----

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: вариант А: 37±2°C, 10 минут; вариант В: комнатная температура, 15 минут.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 nm.

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.com - www.radim.com



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 4 (с.м.в.) лист 26

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



«УТВЕРЖДАЮ»
 Генеральный директор
 ООО «Компания Алкор Био»
 Швырев М.В.
 «11» _____ 2011г

Компания Алкор Био
 "Alkor Bio"
 Ltd.
 Санкт-Петербург

**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
 АВИДНОСТИ
 ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G К ЦИТОМЕГАЛОВИРУСУ
 В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
 (ЦМВ IgG-авидность)**

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Цитомегаловирус (ЦМВ) представляет собой вирус икосаэдрической формы, 180-250 нм в диаметре, принадлежит к семейству герпесвирусов. Вирус оказывает цитопатическое действие, увеличивая размеры клетки-хозяина за счет цитоплазматических и ядерных включений. В настоящее время ЦМВ признан основным биологическим агентом, который приводит к врожденным аномалиям вследствие внутриутробной инфекции. Около 2% беременных женщин подвергаются первичной инфекции или реинфекции. 10-20% новорожденных детей с врожденной ЦМВ-инфекцией имеют выраженные признаки нарушения центральной нервной системы. В настоящее время принято считать, что врожденные повреждения вызываются преимущественно первичной инфекцией, а не реинфекцией. ЦМВ также является частой причиной осложнений при трансплантации органов, особенно при трансплантации почки. В этом случае первичная инфекция более опасна, чем реинфекция.

Диагностика первичной инфекции посредством определения специфических IgM затруднена, поскольку IgM присутствуют и при обострении инфекции. Кроме того, IgM антитела могут циркулировать от нескольких месяцев до двух лет в случае иммунодепрессивного состояния. Для выявления первичной инфекции особенно полезным оказывается определение авидности специфических IgG. Первичный иммунный ответ на инфекцию характеризуется появлением низкоавидных IgG антител, которые связываются со специфическим антигенным сайтом, но легко диссоциируют.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип действия данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА), в котором сыворотки пациентов, внесенные в лунки микропланшета в дубликатах, реагируют с антигеном ЦМВ, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок. После первой инкубации планшет промывают, а парные лунки инкубируют с разными буферными растворами, один из которых содержит мочевины. Мочевина вызывает диссоциацию ранее образовавшегося комплекса антиген ЦМВ-антитело. Степень диссоциации зависит от авидности антител.

После следующего цикла промывки связанные с твердой фазой антитела вступают в реакцию с антителами против IgG человека, мечеными пероксидазой хрена, которая, в свою очередь, реагирует с раствором ТМБ. Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Процент авидности вычисляют как отношение между оптическими плотностями в парных лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет MTP	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Concentrated
Раствор для разведения образцов DIL	1 x 20 мл	Концентрат Concentrated
Контроль Низкоавидный CTR BA	1 x 2 мл	Лиофилизирован Lyophilized
Контроль Высокоавидный CTR AA	1 x 2 мл	Лиофилизирован Lyophilized
Реагент для диссоциации	1 x 10 мл	Готов к использованию

DISS		Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок, что соответствует 45 определениям.

2.2.1. Специфические реагенты

- **Иммуносорбент (MTP) / Coated microplate:** Планшет из 12 стрипов по 8 лунок: внутренняя поверхность лунок покрыта очищенным и инактивированным антигеном ЦМВ. Неиспользованные стрипы поместить в пластиковый пакет (прилагается) и плотно закрыть; хранить при температуре +2...8°C.

- **Низкоавидный контроль (CTR BA) / Low avidity control:** 1 флакон. Лиофилизированный препарат красного цвета. Изготовлен на основе сыворотки крови, содержащей низкоавидные IgG человека к ЦМВ. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Перед использованием восстановите содержимое флакона в 2 мл дистиллированной или деионизованной воды. Восстановленный реагент хранить не более 2 месяцев при температуре +2...8°C. Для длительного хранения заморозить при температуре -20°C.

- **Высокоавидный контроль (CTR AA) / High avidity control:** 1 флакон. Лиофилизированный препарат синего цвета. Изготовлен на основе сыворотки крови, содержащий высокоавидные человеческие IgG против ЦМВ. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Перед использованием восстановите содержимое флакона в 2 мл дистиллированной или деионизованной воды. Восстановленный реагент хранить не более 2 месяцев при температуре +2...8°C. Для длительного хранения заморозить при температуре -20°C.

- **Реагент для диссоциации (DISS) / Dissociating reagent:** 1 флакон. Содержит буферный раствор с мочевиной. Готов к использованию.

- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme conjugate:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержащий мышинные моноклональные антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO). Готов к использованию. Раствор розового цвета. Консервант: неомицин.

2.2.2. Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

- **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing solution (concentrated):** 1 флакон. Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин-20. Консервант: тимеросал (< 0.05%). Перед использованием разведите необходимое количество концентрата в соотношении 1:20 дистиллированной водой. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C.

- **Раствор для разведения образцов 20x (DIL) / Sample Diluent (concentrated):** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Жидкость красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Перед использованием разведите концентрат в соотношении 1:20 предварительно разведенным промывочным раствором (см. выше). Приготовленный раствор для разведения хранить не более 30 суток при +2...8°C.

- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H_2O_2 . Готов к использованию.

- **Стоп реагент (STOP) / Blocking reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.

- **Пленка для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**

- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе из 118 образцов сыворотки крови пациентов с перенесенной ранее или повторной инфекцией. Диагностическая специфичность метода составляет 97,4%.

3.2. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе из 33 образцов сыворотки крови пациентов с первичной инфекцией. Диагностическая чувствительность метода составляет 93,9%.

3.3. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется, как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матриксе образца.

Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина).

3.4. Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с разными % avidности.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Авидность, %			Коэффициент вариации, %	Количество репликаторов
	Среднее значение	±	Стандартное отклонение		
a	11.5	±	0.8	7.1	10
b	53.2	±	3.6	6.7	10
c	82.9	±	2.1	2.5	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Авидность, %			Коэффициент вариации, %	Количество постановок
	Среднее значение	±	Стандартное отклонение		
a	11.15	±	2.98	26.7	10
b	18.44	±	2.26	12.3	10
c	76.39	±	10.64	13.9	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты набора разных серий (см. п.2.2.1). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание разных серий общих реагентов (см. п.2.2.2) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующему неверному результату анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.

– Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

– При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.

– Не разрешается пипетировать ртом.

– Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

– Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

– Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

– Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирачный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

– Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

– Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.

– Градуированные цилиндры для разведения реагентов.

– Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

– Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.

– Дистиллированная вода.

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

– Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компаний RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...+8^\circ\text{C}$ в течение 1-2 суток. Для хранения в течение более длительного времени образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:300 с помощью приготовленного Раствора для разведения (см. п.2.2.2). Например: 10 мкл образца + 2990 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...+25^\circ\text{C}$).

– Перед проведением анализа тщательно перемешайте образцы.

7.1. Составьте схему нанесения образцов на планшет. Отметьте по 2 лунки для: обнуления спектрофотометра (Blank), Низкоавидного контроля, Высокоавидного контроля и каждого из исследуемых образцов.

7.2. Внесите по 100 мкл Низкоавидного контроля в лунки C1 и D1; по 100 мкл Высокоавидного контроля в лунки E1 и F1; по 100 мкл предварительно разведенных образцов в дубликатах – во все остальные лунки.

7.3. Закройте планшет клейкой пленкой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60±5 минут при 37±2°C.

7.4. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза, внося при каждой промывке по 350 мкл предварительно разведенного Промывочного раствора в каждую лунку. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.5. Внесите по 100 мкл Раствора для разведения образцов в нечетные лунки (A1, C1, E1, G1 и т.д.) и по 100 мкл Реагента для диссоциации в четные лунки (B1, D1, F1, H1 и т.д.).

7.6. Закройте планшет клейкой пленкой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 30±2 минут при 37±2°C.

7.7. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п. 7.4).

7.8. Внесите во все лунки по 100 мкл Конъюгата.

7.9. Закройте планшет клейкой пленкой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 30±2 минут при 37±2°C.

7.10. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п. 7.4).

7.11. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.

7.12. Инкубируйте в течение 10 минут при 37±2°C. Избегайте попадания света на планшет.

7.13. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с инструкцией по эксплуатации анализатора.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 7.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить диапазон линейного измерения.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычитите среднее значение оптической плотности (ОП) лунок A1, B1 из значений ОП других лунок.

Убедитесь, что ОП каждого образца, инкубированного с Раствором для разведения образцов > 0,300 ед.опт.плотн.. Если это так, можно выполнять расчеты. Если ОП образца < 0,300 ед.опт.плотн., это свидетельствует, что образец не содержит достаточную концентрацию антител для определения авидности IgG (пациент либо не имеет иммунитета к цитомегаловирусной инфекции, либо находится в периоде, когда иммунный ответ еще не сформирован).

Для каждого образца и контроля рассчитайте процентное отношение ОП лунки, инкубированной с Реагентом для диссоциации и ОП лунки, инкубированной с Раствором для разведения.

ОП с Реагентом для диссоциации

x 100 = % Авидности

ОП с Раствором для разведения

Если ОП образца при длине волны 450 нм > 3,000 ед.опт.плотн. в любой из лунок, следует измерить ОП повторно при длине волны 405 нм. Процент авидности рассчитывается по формуле (см выше) на основании ОП при 405 нм.

9.1. Пример расчета

Образец	ОП с Раств. для разведения	ОП с Реаг. для диссоциации	% Авидности
Низкоавидный контроль	0,947	0,178	18,8

Высокоавидный контроль	1,244	0,972	78,1
Образец	0,565	0,080	14,1

9.2. Критерии достоверности

ОП при длине волны 450 нм в лунках с Высокоавидным и Низкоавидным контролями после инкубации с Раствором для разведения должна быть > 0,500 ед.опт.плотн.

Процент авидности должен быть ниже 35% для Низкоавидного контроля и выше 45% для Высокоавидного контроля. В любом случае, результаты анализа должны подтверждаться клиническими наблюдениями и результатами других диагностических тестов.

9.3. Интерпретация результатов

% авидности > 45% =	IgG против ЦМВ с высокой авидностью
% авидности 35-45% =	IgG против ЦМВ со средней авидностью (т.н. «серая зона»)
% авидности < 35% =	IgG против ЦМВ с низкой авидностью

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор хранить при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Наличие высокоавидных антител не исключает возможность недавнего инфицирования. Тем не менее, учитывая высокую специфичность данного анализа, положительный результат позволяет с высокой степенью достоверности предполагать, что инфицирование произошло в предшествующие 3 месяца.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:300

Лунки	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
Реагент								
Низкоавидный контроль CTR BA	----	----	100 мкл	100 мкл	----	----	----	----
Высокоавидный контроль CTR AA	----	----	----	----	100 мкл	100 мкл	----	----
Образец	----	----	----	----	----	----	100 мкл	100 мкл

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин
- Промывка: 4 x 350 мкл

Раствор для разведения образцов DIL	100 мкл	----	100 мкл	----	100 мкл	----	100 мкл	----
Реагент для диссоциации DISS	----	100 мкл	----	100 мкл	----	100 мкл	----	100 мкл

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 10 мин.

Стоп реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Считывание при длине волны 450-405 нм.

еральный директор
О «Компания Алкор Био»

оводитель лаборатории разработки ИФА-систем
О «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 7 (силь) лист св

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Швырев М.В.
« 11 » ноября 2011г

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М К ЦИТОМЕГАЛОВИРУСУ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ЦМВ IgM

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Цитомегаловирус (ЦМВ) представляет собой вирус икосаэдрической формы, 180-250 нм в диаметре, принадлежит к семейству герпесвирусов. Вирус оказывает цитопатическое действие, увеличивая размеры клетки-хозяина за счет цитоплазматических и ядерных включений. В настоящее время ЦМВ признан основным биологическим агентом, который приводит к врожденным аномалиям вследствие внутриутробной инфекции. Около 2% беременных женщин подвергаются первичной инфекции или реинфекции. 10-20% новорожденных детей с врожденной ЦМВ-инфекцией имеют выраженные признаки нарушения центральной нервной системы. Врожденная инфекция также может быть следствием эндогенной реактивации вируса в организме беременной женщины. В последнее время ЦМВ определяют как основную причину осложнений при трансплантации органов, особенно при трансплантации почки. Процент ЦМВ инфекции как следствие трансплантации от ЦМВ-позитивного донора ЦМВ-негативному субъекту составляет от 52 до 100%. ЦМВ инфекция широко распространена: антитела к ЦМВ были обнаружены у 50-70% населения старше 35 лет. Обычно ЦМВ инфекция протекает бессимптомно. В результате первичной ЦМВ инфекции антитела класса IgM против ЦМВ сохраняются у иммунокомпетентных пациентов на период от 2 до 9 месяцев; у пациентов с нарушениями иммунной системы эти антитела могут сохраняться более 2 лет.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип действия данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА), вариант «capture». В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела класса IgM против ЦМВ (если они есть в образце) улавливаются антителами против μ -цепей иммуноглобулинов М человека, адсорбированными на твердой фазе (в лунках планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение последующей инкубации комплекс антиген ЦМВ – биотинилированные антитела реагирует с антителами IgM против ЦМВ, избыток антител удаляется при промывке. Во время третьей инкубации стрептавидин, меченный пероксидазой хрена, взаимодействует с биотином. После цикла промывки в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание антител класса IgM в образцах и контролях прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет MTP	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Конс.
Раствор для разведения DIL	1 x 100 мл	Готов к использованию Ready for use
Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Положительный контроль	1 x 2 мл	Готов к использованию

POS		Ready for use
Cut-off контроль C/O	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
Антиген Ag	7 x 2,5 мл	Лиофилизирован
Конъюгат/биотин CONJ/BIO	1 x 19 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат с пероксидазой CONJ	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Специфические реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplates:** лунки стрипов планшета покрыты моноклональными антителами против иммуноглобулинов М человека. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).
- **Положительный контроль (POS) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgM к ЦМВ. Готов к использованию. Консервант: NaN₃ (< 0,1%).
- **Cut-off контроль (C/O) / Cut-off Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgM к ЦМВ. Готов к использованию. Консервант: NaN₃ (< 0,1%). Раствор голубого цвета.
- **Антиген цитомегаловируса (Ag) / CMV Antigen:** 7 флаконов. Содержат инактивированный антиген ЦМВ. Перед использованием растворите содержимое каждого флакона в 2,5 мл раствора конъюгат/биотин. Восстановленный реагент хранить не более 3 суток при температуре +2...8°C или 1 месяц при -20°C. Повторное замораживание не допускается.
- **Конъюгат/биотин (CONJ/BIO) / Biotinylated Conjugate:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержит моноклональные антитела против ЦМВ, конъюгированные с биотином. Готов к использованию. Консервант: неомицин.
- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержащий стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRPO). Готов к использованию. Консервант: неомицин.

2.2.2. Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

- **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing Solution (concentrated):** 1 флакон. Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: тимеросал (< 0.05%). Перед использованием разведите необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C.
- **Раствор для разведения (DIL) / Sample Diluent:** 1 флакон. Фосфатно-солевой буферный раствор со стабилизаторами. Жидкость красного цвета. Консервант: NaN₃ (< 0.1%). Готов к использованию.
- **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, не содержит антител класса IgM к ЦМВ. Готов к использованию. Консервант: NaN₃ (< 0.1%). Раствор красного цвета.
- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буферном растворе, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе из 236 образцов, отрицательных по содержанию антител IgM класса против ЦМВ. Специфичность составляет 100%. В представленном методе отсутствует влияние ревматоидного фактора и IgM других вирусов герпеса (вирус Эпштейна – Барр, вирус ветряной оспы, вирус простого герпеса).

3.2. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе из 61 образцов, полученных от пациентов с острой цитомегаловирусной инфекцией. Чувствительность составляет 93,4%.

3.3. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матриксе образца. Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина).

3.4. Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител класса IgM против ЦМВ.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	$\pm$ (Индекс)	S.D.	C.V. %	Кол-во репликатов
a	11,7	$\pm$	0,3	2,28	10
b	4	$\pm$	0,2	6,19	10
c	1,9	$\pm$	0,11	5,57	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	$\pm$ (Индекс)	S.D.	C.V. %	Кол-во постановок
a	19,01	$\pm$	2,74	14,40	10
b	2,18	$\pm$	0,28	13,07	10
c	1,57	$\pm$	0,22	13,80	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты набора разных серий (см. п.2.2.1). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.

- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующему неверному результату анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липимичные образцы, а также присутствие в образцах

фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре +2...8°C в течение 1 недели. Для хранения в течение более длительного времени образцы следует заморозить при -20°C. Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:100 с помощью приготовленного Раствора для разведения (см. п.2.2.2). Например: 10 мкл образца + 990 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры (+18...25°C).

– Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Контроли вносятся в дубликатах, образцы - в монопликатах. Оставьте лунку для обнуления (Blank).

7.2. Внесите по 100 мкл Контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Внесите 100 мкл приготовленного Раствора для разведения в лунку для обнуления.

7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60±5 минут при 37±2°C.

7.5. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза, внося при каждой промывке по 350 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.6. Внесите во все лунки по 100 мкл Антигена, восстановленного раствором конъюгат/биотин.

7.7. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60±2 минут при 37±2°C.

7.8. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.5).

7.9. Внесите во все лунки по 100 мкл Конъюгата (стрептавидин-пероксидаза).

7.10. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 30±2 минут при 37±2°C.

7.11. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.5).

7.12. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.

7.13. Инкубируйте в течение 20±2 минут при 37±2°C. Избегайте попадания света на планшет.

7.14. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 7.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определить оптическую плотность (ОП) отрицательного контроля, положительного контроля и Cut-off контроля (пороговое значение). Присутствие или отсутствие антител класса IgM против ЦМВ определяется путем сравнения ОП образца с ОП Cut-off контроля.

Образцы с ОП ниже ОП Cut-off контроля признают не реактивными (не содержащими антитела класса IgM против ЦМВ).

Образцы с ОП выше ОП Cut-off контроля признают реактивными (содержащими антитела класса IgM против ЦМВ).

Область значений ОП ± 10% от ОП Cut-off контроля является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, требуется повторное тестирование для подтверждения.

9.1. Критерии достоверности

Прежде чем начать подсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

Описание	Условие
Отрицательный контроль	< 0,100
Cut-off контроль	> 0,200
Положительный контроль	> 0,700

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.2. Интерпретация результатов

Результат определяется как отношение ОП образца к ОП Cut-off контроля. Эта величина называется индексом.

$$\text{Индекс} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП Cut-off контроля}}$$

- Образцы с Индексом < 0,9 признают отрицательными по содержанию антител класса IgM против ЦМВ.
- Образцы с Индексом > 1,1 признают положительными по содержанию антител класса IgM против ЦМВ.
- Образцы с Индексом 0,9 – 1,1 (ОП $\pm$ 10% от Cut-off контроля) считаются сомнительными и требуют повторного тестирования.

9.3. Пример подсчета

Нижеследующие данные приведены в качестве примера и не могут быть использованы как экспериментальные результаты.

Описание	ОП 450 nm	ЦМВ IgM	Индекс
Отрицательный контроль	0,023		
Cut-off контроль	0,424		
Положительный контроль	1,252		
Образец	0,932	+	2.2

Исследуемый образец признается положительным (+) по содержанию антител класса IgM против ЦМВ.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

При определении уровня иммунитета пациента против ЦМВ, присутствие антител класса IgG не исключает возможность текущей инфекции. Таким образом, определение специфических антител класса IgM является основным методом для ранней диагностики острой инфекции. В случае заболевания раннее вмешательство значительно уменьшает риск. Применение варианта «capture» ИФА позволяет значительно снизить возможность неспецифических реакций. Однако результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:100

Реагенты \ Лунки	Blank	Отрицательный контроль NEG	Контроль cut-off C/O	Положительный контроль POS	Образцы
Отрицательный контроль NEG	-----	100 мкл	-----	-----	-----
Контроль cut-off C/O	-----	-----	100 мкл	-----	-----
Положительный контроль POS	-----	-----	-----	100 мкл	-----
Образцы	-----	-----	-----	-----	100 мкл
Раствор для разведения DIL	100 мкл	-----	-----	-----	-----

- Инкубация: 37°±2°C, 60±5 мин.
- Удаление содержимого из лунок, промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор антигена в конъюгате с биотином Ag +CONJ BIO	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
---	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37°±2°C, 60±5 мин.
- Удаление содержимого из лунок, промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат с пероксидазой CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------------------------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37°±2°C, 30±2 минут
- Удаление содержимого из лунок, промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37°C±2°C, 20±2 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------	---------	---------

- Считывание: 450-405 nm.

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia
Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443
National Order Entry: +39 06 91.249.702
Export Department: +39 06 91.249.701
Customer Care: +39 06 91.249.700
info@radim.it - www.radim.it



Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 7 (семь) листов

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G ПРОТИВ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1 ТИПА
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
ВПГ 1 IgG**

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Вирус простого герпеса (ВПГ), цитомегаловирус, вирус ветряной оспы и вирус Эпштейн-Барра принадлежат к семейству герпесвирусов.

Известны два вида ВПГ с общими и специфическими антигенными характеристиками:

- вирус простого герпеса тип 1 (ВПГ-1), локализующийся главным образом на орбитальных и лабиальных областях;
- вирус простого герпеса тип 2 (ВПГ-2), поражающий, как правило, органы репродуктивной системы у мужчин и женщин.

ВПГ обладает высокой патогенностью, передается через прямой и непрямой контакт и половым путем. Герпетическая инфекция клинически проявляется в виде высыпаний на губах (Herpes labialis) или половых органах (Herpes genitalis) и герпетической экземы. Однако встречаются и более опасные формы. Инфицирование во время беременности (главным образом ВПГ 2 типа) может привести к врожденным порокам развития плода.

Антитела класса IgM против ВПГ появляются в течение первой недели после проникновения возбудителя и сохраняются в течение нескольких месяцев. Антитела класса IgG появляются примерно на 10 день после инфицирования и могут определяться годами, иногда титр их меняется при реинфицировании или реактивации латентного вируса.

Наиболее распространенными тестами для определения антител к ВПГ являются тесты нейтрализации, иммунофлюоресценции (прямой или непрямой) и иммуноферментный анализ для IgG и IgM.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип работы данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела класса IgG против ВПГ 1 типа (если они есть в образце) связываются с антигеном ВПГ 1 типа, адсорбированным на твердой фазе (в лунках планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение следующей инкубации антитела против IgG человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом антиген ВПГ 1 типа – антитело. После цикла промывок в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 или 405 нм. Содержание антител класса IgG против вируса простого герпеса 1 типа в контролях и образцах прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество		Состояние
	1й вариант комплектации	2й вариант комплектации	
Планшет MTP	1 x 96 лунок	2 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	2 x 50 мл	Концентрат Conc.
Раствор для разведения DIL	1 x 20 мл	2 x 20 мл	Концентрат Conc.

Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Положительный контроль POS	1 x 2 мл	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Cut-off контроль C/O	1 x 2,5 мл	1 x 2,5 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Набор рассчитан на определение в монопликатах 89 неизвестных образцов и одной пробы для определения оптической плотности раствора для разведения образцов, в дубликатах трех контрольных образцов при использовании всех стрипов одновременно

Количество реагентов рассчитано на 96 или на 192 лунки.

2.2.1 Специфические реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplates:** лунки стрипов планшета покрыты очищенным и инактивированным антигеном ВПГ 1 типа. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...+8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

- **Положительный контроль (POS) / Positive Control:** раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgG к ВПГ 1 типа. Готов к использованию. Консервант: NaN_3 (<0.1%).

- **Cut-off контроль (C/O) / Cut-off Control:** раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgG к ВПГ 1 типа. Готов к использованию. Раствор голубого цвета. Консервант: NaN_3 (<0.1%).

- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержащий мышинные моноклональные антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO).. Готов к использованию. Раствор розового цвета. Консервант: неомицин.

2.2.2 Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H.-S.T.D.» производства компании RADIM.

- **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing Solution (concentrated):** фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: Тимеросал (< 0.05%). Перед использованием разведите необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...+8°C.

- **Раствор для разведения 20x (DIL) / Sample Diluent (concentrated):** раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Жидкость красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Непосредственно перед применением растворяется в отношении 1:20 подготовленным к использованию промывочным раствором (см. выше). Приготовленный раствор для разведения хранить не более 30 суток при +2...+8°C.

- **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** раствор на основе сыворотки крови, не содержит антител класса IgG к ВПГ 1 типа. Готов к использованию. Раствор красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%).

- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон (14 мл). Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H_2O_2 . Готов к использованию.

- **Стоп-реагент(STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон (14 мл). 1N HCl. Готов к использованию.

- **Бумага для заклеивания планшета (CPA).**

- **Пластиковый пакет с замком.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на образцах, полученных от пациентов, не имеющих иммунитета к ВПГ 1 типа. Специфичность составляет 100%.

3.2. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на образцах, полученных от группы пациентов, перенесших в прошлом инфекцию, вызванную ВПГ 1 типа. Чувствительность составляет 97,6%.

3.3. Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител класса IgG против ВПГ 1 типа.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	$\pm$ ОП (450 нм)	S.D.	C.V. %	Количество репликатов
a	0,570	$\pm$	0,028	4,8	12
b	1,027	$\pm$	0,063	6,2	12
c	2,718	$\pm$	0,104	3,8	12

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	$\pm$ ОП (450 нм)	S.D.	C.V. %	Кол-во постановок
a	0,431	$\pm$	0,06	13,8	10
b	1,870	$\pm$	0,286	15,3	10
c	3,547	$\pm$	0,397	11,1	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты набора разных серий (см. п.2.2.1). Не смешивайте с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующему неверному результату анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Мерные цилиндры.
- Дистиллированная или деионизованная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC. В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липимичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. При необходимости более длительного хранения образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:300 с помощью приготовленного Раствора для разведения (см. п.2.2.2.). Например: 10 мкл образца + 2990 мкл раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей (в дубликатах) и исследуемых образцов (в монопликатах). Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank).

7.2. Внесите по 100 мкл контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Внесите 100 мкл приготовленного Раствора для разведения в лунку для обнуления.

7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60 ± 5 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

7.5. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза, внося при каждой промывке по 350 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

- 7.6. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Конъюгата.
- 7.7. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **30±2 минут при 37±2°C**.
- 7.8. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.5).
- 7.9. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Раствора ТМБ.
- 7.10. Инкубируйте в течение **10 минут при 37±2°C** или **15 минут при комнатной температуре (18-25°C)**. Избегайте прямого попадания солнечного света на планшет.
- 7.11. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Стоп-реагента.
- * При использовании автоматического анализатора производства компаний RADIM или/и SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 7

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ *

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Определить оптическую плотность (ОП) отрицательного контроля, положительного контроля и cut-off контроля (пороговое значение). Присутствие или отсутствие антител класса IgG против ВПГ 1 типа определяется путем сравнения ОП образца с ОП Cut-off контроля.

Образцы с ОП ниже ОП Cut-off признают нереактивными (не содержащими антитела класса IgG против ВПГ 1 типа).

Образцы с ОП выше ОП Cut-off признают реактивными (содержащими антитела класса IgG против ВПГ 1 типа).

Область значений ОП ± 10% от ОП калибратора является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требует повторного тестирования для подтверждения.

9.2. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

Описание	Условие
Отрицательный контроль	< 0,200
Положительный контроль	> 0,700

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.3. Интерпретация результатов

Результат определяется как отношение ОП образца к ОП Cut-off контроля. Эта величина называется индексом.

$$\text{Индекс} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП Cut-off контроля}}$$

- Образцы с Индексом < 0,9 признают отрицательными по содержанию антител IgG класса против ВПГ 1 типа.

- Образцы с Индексом > 1,1 признают положительными по содержанию антител IgG класса против ВПГ 1 типа.

- Образцы с Индексом 0,9 – 1,1 (ОП ± 10% от Cut-off контроля) считаются сомнительными и требуют повторного тестирования.

Образцы сыворотки крови, полученные от одного пациента с промежутком времени, должны сравниваться только при исследовании в одном и том же анализе. В этом случае 60% увеличение ОП во втором образце является значимым признаком недавней или развивающейся инфекции. В этом случае образцы тестируются на присутствие специфических IgM.

9.4. Пример подсчета

Нижеследующие данные приведены в качестве примера и не могут быть использованы как экспериментальные результаты.

Описание	ОП (450 нм)	IgG к ВПГ 1	Индекс
Отрицательный контроль	0,082		
Cut-off контроль	0,504		
Положительный контроль	1,992		
Образец	0,889	+	1,76

Исследуемый образец определен как положительный (+) на наличие антител класса IgG к ВПГ 1 типа.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Наличие антител класса IgG к ВПГ 1 типа в любых концентрациях не исключает текущей инфекции. Таким образом, определение специфических антител класса IgM является основным для ранней диагностики острой инфекции. В случае заболевания раннее вмешательство значительно уменьшает риск. Однако результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:300

Лунки	Blank	Контроли	Образцы
Реагенты			
Отрицательный, положительный и cut-off контроли NEG POS C/O	-----	100 мкл	-----
Образцы	-----	-----	100 мкл
Раствор для разведения DIL	100 мкл	-----	-----

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: вариант А: 37±2°C, 10 мин; вариант В: комнатная температура, 15 мин

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм.

альный директор
«Компания Алкор Био»

одитель лаборатории разработки ИФА-систем
«Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia
Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443
National Order Entry: +39 06 91.249.702
Export Department: +39 06 91.249.701
Customer Care: +39 06 91.249.700
info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 4 (смб) лист сб

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



«УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 11 » июля 2011г



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ
G ПРОТИВ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 2 ТИПА
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
ВПГ 2 IgG**

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Вирус простого герпеса (ВПГ), цитомегаловирус, вирус ветряной оспы и вирус Эпштейн-Барра принадлежат к семейству герпесвирусов.

Известны два вида ВПГ с общими и специфическими антигенными характеристиками:

- вирус простого герпеса тип 1 (ВПГ-1), локализующийся главным образом на орбитальных и лабиальных областях;

- вирус простого герпеса тип 2 (ВПГ-2), поражающий, как правило, органы репродуктивной системы у мужчин и женщин.

ВПГ обладает высокой патогенностью, передается через прямой и непрямой контакт и половым путем. Герпетическая инфекция клинически проявляется в виде высыпаний на губах (Herpes labialis) или половых органах (Herpes genitalis) и герпетической экземы. Однако встречаются и более опасные формы. Инфицирование во время беременности (главным образом ВПГ 2 типа) может привести к врожденным порокам развития плода.

Антитела класса IgM против ВПГ появляются в течение первой недели после проникновения возбудителя и сохраняются в течение нескольких месяцев. Антитела класса IgG появляются примерно на 10 день после инфицирования и могут определяться годами, иногда титр их меняется при реинфицировании или реактивации латентного вируса.

Наиболее распространенными тестами для определения антител к ВПГ являются тесты нейтрализации, иммунофлюоресценции (прямой или непрямой) и иммуноферментный анализ для IgG и IgM.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип работы данного набора основан на иммуноферментном твердофазном анализе (ИФА). В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела класса IgG против ВПГ 2 типа (если они есть в образце) связываются с антигеном ВПГ 2 типа (гликопротеин gG2), адсорбированном на твердой фазе (в лунках планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение следующей инкубации антитела против IgG человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом антиген ВПГ 2 типа – антитело. После цикла промывки в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание антител класса IgG против вируса простого герпеса 2 типа в контролях и образцах прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество		Состояние
	1й вариант комплектации	2й вариант комплектации	
Планшет MTP	1 x 96 лунок	2 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	2 x 50 мл	Концентрат Conc.
Раствор для разведения DIL	1 x 20 мл	2 x 20 мл	Концентрат Conc.
Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use

Положительный контроль POS	1 x 2 мл	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Cut-off контроль C/O	1 x 2,5 мл	1 x 2,5 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Номер набора ВПГ 2 IgG по каталогу Алкор Био	200-11		

Количество реагентов рассчитано на 96 (REF KH2G) или на 192 (REF KH2GB) лунки.

2.2.1. Специфические реагенты

• **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplates** лунки стрипов планшета покрыты специфическим гликопротеином gG2 (антиген ВПГ 2 типа). Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

• **Положительный контроль (POS) / Positive Control:** раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgG к ВПГ 2 типа. Готов к использованию. Консервант: NaN₃ (<0.1%).

• **Cut-off контроль (C/O) / Cut-off Control:** раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgG к ВПГ 2 типа. Готов к использованию. Раствор голубого цвета. Консервант: NaN₃ (<0.1%).

• **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** мышинные моноклональные антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Готов к использованию. Раствор розового цвета. Консервант: неомицин.

2.2.2. Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

• **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing Solution (concentrated):** фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: Тимеросал (< 0.05%). Перед использованием разведите необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить 30 суток при +2...8°C.

• **Раствор для разведения 20x (DIL) / Sample Diluent (concentrated):** раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Жидкость красного цвета. Консервант: NaN₃ (< 0.1%). Непосредственно перед применением разведите в отношении 1:20 подготовленным к использованию промывочным раствором (см. выше). Приготовленный раствор для разведения хранить не более 30 суток при +2...8°C.

• **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** раствор на основе сыворотки крови, не содержит антител класса IgG к ВПГ 2 типа. Готов к использованию. Раствор красного цвета. Консервант: NaN₃ (< 0.1%).

• **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон (14 мл). Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем и DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.

• **Стоп-реагент(STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон (14 мл). 1N HCL. Готов к использованию.

• **Бумага для заклеивания планшета (CPA).**

• **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на образцах, полученных от пациентов, не имеющих иммунитета к ВПГ 2 типа. Специфичность составляет 99,4%.

3.2. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на образцах, полученных от группы пациентов, перенесших в прошлом инфекцию, вызванную ВПГ 2 типа. Чувствительность составляет 97,9%.

3.3. Прецизионность

Прецизионность оценивалась посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител класса IgG против ВПГ 2 типа.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	±	S.D.	C.V.	Кол-во репликатов
		ОП (450 нм)		%	
а	0,294	±	0,018	6,1	12

b	1,433	±	0,059	4,1	12
c	1,936	±	0,122	6,3	12

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	±	S.D.	C.V.	Кол-во постановок
			ОП (450 нм)	%	
a	0,525	±	0,092	17,6	10
b	1,297	±	0,121	9,3	10
c	1,704	±	0,251	14,7	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты набора разных серий (см. п.2.2.1). Не смешивайте с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующему неверному результату анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может

гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

– Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

– Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

– Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.

– Градуированные цилиндры для разведения реагентов.

– Дистиллированная вода.

– Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

– Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 нм и 405 нм.

– Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компаний RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствия в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. Для хранения в течение более длительного времени образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:300 с помощью приготовленного Раствора для разведения (см. п.2.2.2.). Например: 10 мкл образца + 2990 мкл раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).

– Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей (в дубликатах) и исследуемых образцов (в монопликатах). Оставьте лунку для обнуления (Blank).

7.2. Внесите по 100 мкл контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Внесите 100 мкл приготовленного Раствора для разведения в лунку для обнуления.

7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **60 ± 5 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$** .

7.5. Удалите содержимое лунок и промойте их **4 раза**, внося при каждой промывке по 350 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.6. Внесите во все лунки по 100 мкл Конъюгата.

7.7. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **30 ± 2 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$** .

7.8. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.5).

7.9. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.

7.10. Инкубируйте в течение **10 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$ или 15 минут при комнатной температуре ($18-25^\circ\text{C}$)**. Избегайте прямого попадания солнечного света на планшет.

7.11. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить область кривой.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определить оптическую плотность (ОП) отрицательного контроля, положительного контроля и Cut-off контроля (пороговое значение). Присутствие или отсутствие антител класса IgG против ВПГ 2 типа определяется путем сравнения ОП образца с ОП Cut-off контроля.

Образцы с ОП ниже ОП Cut-off признают не реактивными (не содержащими антитела класса IgG против ВПГ 2 типа).

Образцы с ОП выше ОП Cut-off признают реактивными (содержащими антитела класса IgG против ВПГ 2 типа).

Область значений ОП $\pm 10\%$ от ОП калибратора является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требуется повторного тестирования для подтверждения.

9.1. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям.

Описание	Условие
Отрицательный контроль	$< 0,200$
Положительный контроль	$> 0,700$

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.2. Интерпретация результатов

Результат определяется как отношение ОП образца к ОП Cut-off контроля. Эта величина называется индексом.

$$\text{Индекс} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП Cut-off контроля}}$$

– Образцы с Индексом $< 0,9$ признают отрицательными по содержанию антител IgG класса против ВПГ 2 типа.

– Образцы с Индексом $> 1,1$ признают положительными по содержанию антител IgG класса против ВПГ 2 типа.

– Образцы с Индексом $0,9 - 1,1$ (ОП $\pm 10\%$ от Cut-off контроля) считаются сомнительными и требуют повторного тестирования.

Образцы сыворотки крови, полученные от одного пациента с промежутком времени, должны сравниваться только при исследовании в одном и том же анализе. В этом случае 60% увеличение ОП во втором образце является значимым признаком недавней или развивающейся инфекции. В этом случае образцы тестируются на присутствие специфических IgM.

9.3. Пример подсчета

Нижеследующие данные приведены в качестве примера и не могут быть использованы как экспериментальные результаты.

Описание	ОП при 450 нм	IgG к ВПГ 2	Индекс
Отрицательный контроль	0,082		
Cut-off контроль	0,504		
Положительный контроль	1,992		
Образец	0,889	+	1,76

Исследуемый образец определен как положительный (+) на наличие антител класса IgG к ВПГ 2 типа.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

– Набор должен храниться при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$.

- Срок годности реагентов указан на этикетке флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Наличие антител класса IgG к ВПГ 2 типа в любых концентрациях не исключает текущей инфекции. Таким образом, определение специфических антител класса IgM является основным для ранней диагностики острой инфекции. В случае заболевания раннее вмешательство значительно уменьшает риск. Однако результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:300

Реагенты	Лунки	Blank	Контроли	Образцы
Отрицательный, положительный и cut-off контроли NEG POS C/O		-----	100 мкл	-----
Образцы		-----	-----	100 мкл
Раствор для разведения DIL		100 мкл	-----	-----

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: вариант А: 37±2°C, 10 мин; вариант В: комнатная температура, 15 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм.

генеральный директор
ОО «Компания Алкор Био»

руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ОО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia
Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443
National Order Entry: +39 06 91.249.702
Export Department: +39 06 91.249.701
Customer Care: +39 06 91.249.700
info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 1 (л. 43) лист 43

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 12 » июля 2011г



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М
ПРОТИВ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1 И 2 ТИПА
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
ВПГ 1/2 IgM**

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Вирус простого герпеса (ВПГ), цитомегаловирус, вирус ветряной оспы и вирус Эпштейн-Барра принадлежат к семейству герпесвирусов.

Известны два вида ВПГ с общими и специфическими антигенными характеристиками:

-вирус простого герпеса тип 1 (ВПГ-1), локализующийся главным образом на орбитальных и лабиальных областях;

-вирус простого герпеса тип 2 (ВПГ-2), поражающий, как правило, органы репродуктивной системы у мужчин и женщин.

ВПГ обладает высокой патогенностью, передается через прямой и непрямой контакт и половым путем. Герпетическая инфекция клинически проявляется в виде высыпаний на губах (Herpes labialis) или половых органах (Herpes genitalis) и герпетической экземы. Однако встречаются и более опасные формы. Инфицирование во время беременности (главным образом ВПГ 2 типа) может привести к врожденным порокам развития плода.

Антитела класса IgM против ВПГ появляются в течение первой недели после проникновения возбудителя и сохраняются в течение нескольких месяцев. Антитела класса IgG появляются примерно на 10 день после инфицирования и могут определяться годами, иногда титр их меняется при реинфицировании или реактивации латентного вируса.

Наиболее распространенными тестами для определения антител к ВПГ являются тесты нейтрализации, иммунофлюоресценции (прямой или непрямой) и иммуноферментный анализ для IgG и IgM.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип работы данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела класса IgM против ВПГ (если они есть в образце) связываются с антигеном ВПГ, адсорбированным на твердой фазе (в лунках планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение следующей инкубации антитела против IgM человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом антиген ВПГ – антитело. После цикла промывки в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание антител класса IgM против вируса простого герпеса в контролях и образцах прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет MTP	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Conc.
Раствор для разведения DIL	1 x 20 мл	Концентрат Conc.
Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use

Положительный контроль POS	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Cut-off контроль C/O	1 x 2,5 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Специфические реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplates:** лунки стрипов планшета покрыты очищенным и инактивированным антигеном ВПГ. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).
- **Положительный контроль (POS) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgM к ВПГ. Готов к использованию. Консервант: NaN₃ (<0.1%).
- **Cut-off контроль (C/O) / Cut-off Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgM к ВПГ. Готов к использованию. Раствор голубого цвета. Консервант: NaN₃ (<0.1%).
- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержит мышинные моноклональные антитела против IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO). Готов к использованию. Раствор розового цвета. Консервант: неомицин.

2.2.2. Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

- **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing Solution (concentrated):** 1 флакон (50 мл). Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: тимеросал (< 0.05%). Перед использованием разведите необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C.
- **Раствор для разведения 20x (DIL) / Sample Diluent (concentrated):** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Жидкость красного цвета. Консервант: NaN₃ (< 0.1%). Непосредственно перед применением разведите в соотношении 1:20 подготовленным к использованию промывочным раствором (см. выше). Приготовленный раствор для разведения хранить не более 30 суток при +2...8°C.
- **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, не содержит антител класса IgM к ВПГ. Готов к использованию. Раствор красного цвета. Консервант: NaN₃ (< 0.1%).
- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA).**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на образцах, полученных от пациентов, не имеющих иммунитета к ВПГ. Специфичность составляет 100%.

3.2. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на образцах, полученных от пациентов с острой герпесвирусной инфекцией. Чувствительность составляет 100%.

3.3. Прецизионность

Прецизионность оценивалась посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициент вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител класса IgM против ВПГ.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение ОП (при 450 нм)	±	S.D.	C.V. %	Кол-во репликаторов
a	0.67	±	0.039	5.8	10
b	1.081	±	0.054	5	10
c	2.061	±	0.074	3.6	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение ОП (при 450 нм)	±	S.D.	C.V. %	Кол-во постановок
a	0.663	±	0.096	14.5	10
b	0.943	±	0.116	12.3	10
c	1.307	±	0.115	8.84	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты набора разных серий (см. п.2.2.1). Не смешивайте с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте дистиллированную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующему неверному результату анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Не смотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

- Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.
- В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. Для хранения в течение более длительного времени образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:300 с помощью приготовленного Раствора для разведения (см. п.2.2.2.). Например: 10 мкл образца + 2990 мкл раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).
 - Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.
- 7.1. Промаркируйте лунки для контролей (в дубликатах) и исследуемых образцов (в монопликатах). Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank).
- 7.2. Внесите по 100 мкл контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки.
- Внимание:** Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.
- 7.3. Внесите 100 мкл приготовленного Раствора для разведения в лунку для обнуления.
- 7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60 ± 5 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 7.5. Удалите содержимое лунок и промойте их 3 раза, внося при каждой промывке по 350 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.
- 7.6. Внесите во все лунки по 100 мкл Конъюгата.

- 7.7. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 30 ± 2 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 7.8. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п. 7.5).
- 7.9. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.
- 7.10. Инкубируйте в течение 10 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$ или 15 минут при комнатной температуре ($+18...25^\circ\text{C}$). Избегайте попадания света на планшет.
- 7.11. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.
- * При использовании автоматического анализатора производства RADIM или/и SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определить оптическую плотность (ОП) отрицательного контроля, положительного контроля и Cut-off контроля (пороговое значение). Присутствие или отсутствие антител класса IgM против ВПГ определяется путем сравнения ОП образца с ОП Cut-off контроля.

Образцы с ОП ниже ОП Cut-off контроля признают не реактивными (не содержащими антитела класса IgM против ВПГ).

Образцы с ОП выше ОП Cut-off контроля признают реактивными (содержащими антитела класса IgM против ВПГ).

Область значений ОП $\pm 10\%$ от ОП Cut-off контроля является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требует повторного тестирования для подтверждения.

9.1. Критерии достоверности

Прежде чем начать подсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

Описание	Условие
Отрицательный контроль	$< 0,200$
Положительный контроль	$> 0,700$

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.2. Интерпретация результатов

Результат определяется как отношение ОП образца к ОП Cut-off контроля. Эта величина называется индексом.

$$\text{Индекс} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП Cut-off контроля}}$$

- Образцы с Индексом $< 0,9$ признают отрицательными по содержанию антител IgM класса против ВПГ.
- Образцы с Индексом $> 1,1$ признают положительными по содержанию антител IgM класса против ВПГ.
- Образцы с Индексом $0,9 - 1,1$ (ОП $\pm 10\%$ от Cut-off контроля) считаются сомнительными и требуют повторного тестирования.

9.3. Пример подсчета

Нижеследующие данные приведены в качестве примера и не могут быть использованы как экспериментальные результаты.

Описание	ОП при 450 нм	IgM к ВПГ	Индекс
Отрицательный контроль	0.082		
Cut-off контроль	0.504		
Положительный контроль	1.500		
Образец	0.889	+	1,76

Исследуемый образец определен как положительный (+) на наличие антител класса IgM к ВПГ.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Наличие антител класса IgG к ВПГ в любых концентрациях не исключает текущей инфекции. Таким образом, определение специфических антител класса IgM является основным методом для ранней диагностики острой инфекции. В случае заболевания раннее вмешательство значительно уменьшает риск. Однако результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:300

Лунки	Blank	Контроли	Образцы
Реагенты			
Отрицательный, положительный и Cut-off контроль NEG POS C/O	-----	100 мкл	-----
Образцы	-----	-----	100 мкл
Раствор для разведения DIL	100 мкл	-----	-----

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин.
- Промывка: 3 x 350 мкл.

Конъюгат CONJ	100 мкл	100 мкл	100 µL
----------------------	---------	---------	--------

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин.
- Промывка: 3 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: вариант А: 37±2°C, 10 мин; вариант В: комнатная температура, 15 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм.

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia
Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443
National Order Entry: +39 06 91.249.702
Export Department: +39 06 91.249.701
Customer Care: +39 06 91.249.700
info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 4 (четыре) лист 06

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 11 » мая 2011г



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G
K *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
Хламидии IgG**

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

К роду *Chlamydia* относятся чувствительные к антибиотикам грамотрицательные бактерии. В хламидийных клетках содержится как ДНК, так и РНК, а также рибосомы. Размножение осуществляется простым делением. Хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами.

Все представители рода *Chlamydia* имеют общий групповой, родоспецифичный антиген (липополисахаридный комплекс), хотя могут отличаться между собой серологически и по степени патогенности. *Chlamydia trachomatis* является возбудителем одного из наиболее распространенных заболеваний, передающихся половым путем. Этот вид является основной причиной инфекций мочеполовой системы у мужчин (негонококковый уретрит, эпидидимит) и часто вызывает воспалительные процессы у женщин.

Хламидийную инфекцию половых путей мужчин часто классифицируют как негонококковый уретрит. При двойной инфекции с *Neisseria gonorrhoeae* развивается постгонококковый уретрит. Наиболее частым осложнением хламидийного уретрита у мужчин является эпидидимит.

У женщин наиболее часто инфицируется шейка матки. Если хламидиальный цервицит не выявлен своевременно, воспалительный процесс может распространиться на фаллопиевы трубы и вызвать сальпингит, следствием которого может быть бесплодие. *Chlamydia trachomatis* участвует также в воспалительных процессах органов малого таза, включая воспаления шейки матки, собственно матки, фаллопиевых труб и яичников.

Обследование беременных женщин на наличие антител к *Chlamydia trachomatis* позволяет установить правильный диагноз и избежать возможных осложнений. Своевременная диагностика позволяет предотвратить передачу инфекции от матери к плоду. Инфицирование плода приводит к серьезным последствиям, включая конъюнктивиты, пневмонию и другие осложнения.

Для широкомасштабных программ скрининга популяции с умеренным или низким риском инфицирования диагностика возбудителя путем выделения из культуры клеток экономически нецелесообразна по причине трудоемкости сбора и транспортировки образцов и технической сложности анализа.

Научными исследованиями было подтверждено, что высокие концентрации специфических антител класса IgG и IgA к антигену *Chlamydia* в сыворотке крови могут служить адекватным маркером для ранней диагностики хламидийной инфекции без применения инвазивных процедур.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе использован принцип иммуноферментного анализа (ИФА), в качестве ферментной метки применяется пероксидаза хрена. Во время первой инкубации антитела класса IgG к антигену *Chlamydia* (если они есть в образце) связываются с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном *Chlamydia* (серотип L2). Несвязавшийся материал удаляется с помощью промывки. При последующей инкубации к образовавшемуся комплексу антиген *Chlamydia*-антитело взаимодействует с антителами к иммуноглобулину G человека, конъюгированными с пероксидазой хрена. После повторной промывки в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Цветовую реакцию останавливают добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм и будет прямо пропорциональна концентрации антител класса IgG к *Chlamydia* в контрольных и исследуемых образцах.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет MTP	1x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Положительный контроль POS	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Контроль Cut-off C/O	1 x 2,5 мл	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Конс.
Раствор для разведения DIL	1 x 20 мл	Концентрат Конс.
Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Специфические реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок), лунки стрипов планшета покрыты очищенным и инактивированным антигеном *Chlamydia trachomatis*. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете.

- **Положительный контроль (POS) / Positive Control:** – 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgG к антигену *Chlamydia*. Готов к использованию. Консервант: NaN_3 (< 0,1%).

- **Контроль Cut-off (C/O) / Cut-off Control:** – 1 флакон. Раствор голубого цвета на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgG к антигену *Chlamydia*. Готов к использованию. Консервант: NaN_3 (< 0,1%).

- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme conjugate:** – 1 флакон. Раствор розового цвета на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержит мышиные моноклональные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO). Готов к использованию. Консервант: неомицин.

2.2.2. Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

- **Промывочный раствор 20x (WASH) / Washing Solution (concentrated):** – 1 флакон. Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: Тимеросал (< 0.05%). Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместить раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C.

- **Раствор для разведения 20x (DIL) / Sample Diluent (concentrated):** – 1 флакон. Раствор красного цвета на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Консервант: NaN_3 (< 0,1%). Непосредственно перед применением развести в соотношении 1:20 подготовленным к использованию промывочным раствором (см. выше). Приготовленный раствор для разведения хранить не более 30 суток при +2...8°C.

- **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** – 1 флакон. Раствор красного цвета на основе сыворотки крови, не содержит антител класса IgG к антигену *Chlamydia*. Готов к использованию. Консервант: NaN_3 (< 0,1%).

- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H_2O_2 . Готов к использованию.

- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.

- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**

- **Пластиковый пакет с замком.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе из 263 образцов, отрицательных по содержанию антител класса IgG к антигену *Chlamydia*. Специфичность составляет 99%.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе из 104 образцов, полученных от пациентов, перенесших хламидиоз и содержащих антитела класса IgG к антигену *Chlamydia*. Чувствительность составляет 93,2%.

3.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матриксе образца. Контрольные исследования показали, что присутствие антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина) не влияют на характеристики анализа.

3.4 Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител класса IgG к антигену *Chlamydia*.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	$\pm$ Индекс	SD	KB, %	Кол-во репликатов
a	2,16	$\pm$	0,23	10,42	10
b	4,95	$\pm$	0,15	3,10	10
c	9,53	$\pm$	0,64	6,77	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	$\pm$ Индекс	SD	KB, %	Кол-во постановок
a	3,69	$\pm$	0,46	12,40	10
b	2,26	$\pm$	0,31	13,60	10
c	1,24	$\pm$	0,14	11,40	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты разных серий набора (см. п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2.) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок, или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующему неверному результату анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.

– Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.

– Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

– При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.

– Не разрешается пипетировать ртом.

– Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

– Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

– Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

– Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирачный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

– Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

– Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.

– Градуированный цилиндр для разведения реагентов.

– Дистиллированная вода.

– Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

– Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620,450 и 405 нм.

– Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа, производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Умеренная липемия в образцах не оказывает влияния на результаты, однако сильная липемия или гемолиз, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. Для хранения в течение более длительного времени образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:300 Раствором для разведения, приготовленным в соответствии с п. 2.2.2. Например: 10 мкл образца + 2990 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).

– Перед проведением анализа тщательно перемешайте образцы.

7.1. Промаркируйте лунки для Контролей и исследуемых образцов. Контроли вносите в дубликатах, образцы - в монопликатах. Оставьте одну лунку для обнуления (Blank).

7.2. Внесите по 100 мкл Контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Внесите 100 мкл подготовленного к использованию Раствора для разведения (см п. 2.2.2.) в лунку для обнуления.

7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60±5 минут при температуре 37±2°C.

7.5. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза, внося при каждой промывке по 350 мкл предварительно разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.6. Внесите во все лунки по 100 мкл Конъюгата.

7.7. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 30±2 минут при 37±2°C.

7.8. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.5).

7.9. Внесите во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ.

7.10. Инкубируйте в течение 10 минут при 37±2°C или 15 минут при комнатной температуре (+18...25°C). Избегайте попадания света на планшет.

7.11. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реактанта.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с Инструкцией по эксплуатации анализатора.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определить оптическую плотность (ОП) Отрицательного контроля, Положительного контроля и Cut-off контроля (пороговое значение). Присутствие или отсутствие антител класса IgG к антигену *Chlamydia trachomatis* определяется путем сравнения ОП образца с ОП Cut-off контроля.

Образцы с ОП ниже ОП Cut-off контроля признают не содержащими антитела класса IgG к антигену *Chlamydia*.

Образцы с ОП выше ОП Cut-off контроля признают содержащими антитела класса IgG к антигену *Chlamydia*.

Область значений ОП ± 10% от ОП Cut-off контроля является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требует повторного исследования для подтверждения.

9.1. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

	Условие
Отрицательный контроль	< 0,200
Положительный контроль	> 0,700

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.2. Интерпретация результатов

Результат определяется как отношение ОП образца к ОП Cut-off контроля. Эта величина называется индексом.

$$\text{Индекс} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП Cut-off контроля}}$$

— Образцы с Индексом < 0,9 признают отрицательными по содержанию антител класса IgG к антигену *Chlamydia*.

— Образцы с Индексом > 1,1 признают положительными по содержанию антител класса IgG к антигену *Chlamydia*.

– Образцы с Индексом 0,9 – 1,1 (ОП $\pm$ 10% от Cut-off контроля) считаются сомнительными и требуют повторного тестирования.

Результаты анализа нескольких образцов, полученных от одного пациента с промежутком времени, допускается сравнивать между собой только в том случае, если все образцы были исследованы в одном и том же анализе. В этом случае изменение ОП во втором образце более чем на 60% можно считать существенным признаком недавней или прогрессирующей инфекции. В этом случае рекомендуется исследовать образец на содержание специфических антител класса IgA.

9.3. Пример подсчета

Нижеследующие данные приведены исключительно в качестве примера. Не следует использовать эти величины вместо подлинных экспериментальных данных.

	ОП 450 nm	IgG	Индекс
Отрицательный контроль	0,082		
Cut-off Контроль	0,450		
Положительный контроль	2,200		
Образец	0,889	+	1,97

Исследуемый образец признается положительным (+) по содержанию антител класса IgG к антигену *Chlamydia*.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

При определении у пациента иммунитета к *Chlamydia* наличие антител класса IgG в любой концентрации не исключает возможности наличия инфекции в настоящий момент. Следовательно, для раннего выявления случаев острой инфекции необходимо определение специфических антител класса IgA. В случае выявления заболевания своевременная медицинская помощь существенно снижает риск отрицательных последствий. Однако, результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:300

Реагенты	Blank	Контроли	Исследуемые образцы
Контроли NEG POS C/O	-----	100 мкл	-----
Исследуемые образцы	-----	-----	100 мкл
Раствор для разведения DIL	100 мкл	-----	-----

- Инкубация: 37 $\pm$ 2°C, 60 $\pm$ 5 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37 $\pm$ 2°C, 30 $\pm$ 2 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: А: 37 $\pm$ 2°C, 10 мин; или В: комнатная температура 15 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------

Определение ОП при 450 - 405 нм.

альный директор
«Компания Алкор Био»

одитель лаборатории разработки ИФА-систем
«Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia
Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443
National Order Entry: +39 06 91.249.702
Export Department: +39 06 91.249.701
Customer Care: +39 06 91.249.700
info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 4 (книжка) лист об

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
_____ М.В. Швырев



«УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 11 » июля 2011г



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ А К *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
Хламидии IgA**

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

К роду *Chlamydia* относятся чувствительные к антибиотикам грамотрицательные бактерии. В хламидийных клетках содержится как ДНК, так и РНК, а также рибосомы. Размножение осуществляется простым делением. Хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами.

Все представители рода *Chlamydia* имеют общий групповой, родоспецифичный антиген (липополисахаридный комплекс), хотя могут отличаться между собой серологически и по степени патогенности. *Chlamydia trachomatis* является возбудителем одного из наиболее распространенных заболеваний, передающихся половым путем. Этот вид является основной причиной инфекций мочеполовой системы у мужчин (негонококковый уретрит, эпидидимит) и часто вызывает воспалительные процессы у женщин.

Хламидийную инфекцию половых путей мужчин часто классифицируют как негонококковый уретрит. При двойной инфекции с *Neisseria gonorrhoeae* развивается постгонококковый уретрит. Наиболее частым осложнением хламидийным уретрита у мужчин является эпидидимит.

У женщин наиболее часто инфицируется шейка матки. Если хламидиальный цервицит не выявлен своевременно, воспалительный процесс может распространиться на фаллопиевы трубы и вызвать сальпингит, следствием которого может быть бесплодие. *Chlamydia trachomatis* участвует также в воспалительных процессах органов малого таза, включая воспаления шейки матки, собственно матки, фаллопиевых труб и яичников.

Обследование беременных женщин на наличие антител к *Chlamydia trachomatis* позволяет установить правильный диагноз и избежать возможных осложнений. Своевременная диагностика позволяет предотвратить передачу инфекции от матери к плоду. Инфицирование плода приводит к серьезным последствиям, включая конъюнктивиты, пневмонию и другие осложнения.

Для широкомасштабных программ скрининга популяции с умеренным или низким риском инфицирования диагностика возбудителя путем выделения из культуры клеток экономически нецелесообразна по причине трудоемкости сбора и транспортировки образцов и технической сложности анализа.

Научными исследованиями было подтверждено, что высокие концентрации специфических антител класса IgG и IgA к антигену *Chlamydia* в сыворотке крови могут служить адекватным маркером для ранней диагностики хламидийной инфекции без применения инвазивных процедур.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе использован принцип иммуноферментного анализа (ИФА), в качестве ферментной метки применяется пероксидаза хрена. Во время первой инкубации антитела класса IgA к *Chlamydia trachomatis* (если они есть в образце) связываются с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном *Chlamydia* (серотип L2). Несвязавшийся материал удаляется с помощью промывки. При последующей инкубации к образовавшемуся комплексу антиген *Chlamydia*-антитело взаимодействуют с антителами к иммуноглобулину А человека, конъюгированными с пероксидазой хрена. После повторной промывки в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Цветовую реакцию останавливают добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм, и будет прямо пропорциональна концентрации антител класса IgA к *Chlamydia* в контрольных и исследуемых образцах.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет	1 x 96 лунок	Готов к использованию

MTP		Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Conc.
Раствор для разведения DIL	1 x 20 мл	Концентрат Conc.
Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Положительный контроль POS	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Cut-off контроль C/O	1 x 2,5мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 определений.

2.2.1. Специфические реагенты

- **Иммуносорбент – планшет **MTP** / Coated microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок), лунки стрипов планшета покрыты очищенным и инактивированным антигеном *Chlamydia trachomatis*. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете.

- **Положительный контроль **POS** / Positive Control:** – 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgA к антигену *Chlamydia*. Готов к использованию. Консервант: NaN₃ (< 0,1%).

- **Контроль Cut-off **C/O** / Cut-off Control:** – 1 флакон. Раствор голубого цвета на основе сыворотки крови, содержит антитела класса IgA к антигену *Chlamydia*. Готов к использованию. Консервант: NaN₃ (< 0.1%).

- **Конъюгат **CONJ** / Enzyme Conjugate:** – 1 флакон. Раствор розового цвета на основе сыворотки крови со стабилизаторами, содержит козьи антитела к IgA человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO). Готов к использованию. Консервант: неомицин.

2.2.2. Реагенты, общие для продуктов линий «To.R.C.H. – S.T.D.» производства компании RADIM

- **Промывочный раствор 20x **WASH** / Washing Solution (concentrated):** – 1 флакон. Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: Тимеросал (< 0.05%). Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместить раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C.

- **Раствор для разведения 20x **DIL** / Sample Diluent (concentrated):** – 1 флакон. Раствор красного цвета на основе сыворотки крови со стабилизаторами. Консервант: NaN₃ (< 0.1%). Непосредственно перед применением развести в соотношении 1:20 подготовленным к использованию промывочным раствором (см. выше). Приготовленный раствор для разведения хранить не более 30 суток при +2...8°C.

- **Отрицательный контроль **NEG** / Negative Control:** – 1 флакон. Раствор красного цвета на основе сыворотки крови, не содержит антител класса IgA к антигену *Chlamydia*. Готов к использованию. Консервант: NaN₃ (< 0.1%).

- **Раствор ТМБ **TMB**:** – 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем и DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.

- **Стоп-реагент **STOP** / Blocking Reagent:** – 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.

- **Бумага для заклеивания планшета **CPA** / Adhesive plate sealers.**

- **Пластиковый пакет с замком.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе из 208 образцов, отрицательных по содержанию антител класса IgA к антигену *Chlamydia*. Специфичность составляет 98%.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе из 59 образцов, полученных от пациентов, перенесших хламидиоз и содержащих антитела класса IgA к антигену *Chlamydia*. Чувствительность составляет 100%.

3.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матрице образца. Контрольные исследования показали, что присутствие антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина) не влияют на характеристики анализа.

3.4 Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител класса IgA к антигену *Chlamydia*.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	±	SD	C.V., %	Кол-во репликаторов
	ОП (при 450 нм)				
a	0.522	±	0.037	7.17	10
b	1.054	±	0.103	9.76	10
c	3.166	±	0.157	4.96	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	±	SD	C.V., %	Кол-во постановок
	ОП (при 450 нм)				
a	0.488	±	0.683	14.0	10
b	1.152	±	0.130	11.3	10
c	2.067	±	0.306	14.8	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты разных серий набора (см. п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.2.) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующему неверному результату анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.

- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.

- Не разрешается пипетировать ртом.

- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирачный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.

- Градуированный цилиндр для разведения реагентов.

- Дистиллированная вода.

- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Умеренная липемия в образцах не оказывает влияния на результаты, однако сильная липемия или гемолиз, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1–2 суток. Для хранения в течение более длительного времени образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:300 Раствором для разведения, приготовленным в соответствии с п. 2.2.2. Например: 10 мкл образца + 2990 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).

- Перед проведением анализа тщательно перемешайте образцы.

7.1. Промаркируйте лунки для Контролей и исследуемых образцов. Контроли вносите в дубликатах, образцы - в монопликатах. Оставьте одну лунку для обнуления (Blank).

7.2. Внесите по 100 мкл Контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

- 7.3. Внесите **100 мкл** подготовленного к использованию Раствора для разведения в лунку для обнуления.
- 7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **60±5 минут** при температуре **37±2°C**.
- 7.5. Удалите содержимое лунок и промойте лунки **4 раза**, внося при каждой промывке **по 350 мкл** предварительно разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.
- 7.6. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Конъюгата.
- 7.7. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение **30±2 минут** при **37±2°C**.
- 7.8. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.5).
- 7.9. Внесите во все лунки **по 100 мкл** раствора ТМБ.
- 7.10. Инкубируйте в течение **10 минут при 37±2°C** или **15 минут при комнатной температуре (+18...25°C)**. Избегайте попадания света на планшет.
- 7.11. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Стоп-реагента.
- * При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с Инструкцией по эксплуатации анализатора.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить область кривой.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определить оптическую плотность (ОП) Отрицательного контроля, Положительного контроля и cut-off контроля (пороговое значение). Присутствие или отсутствие антител класса IgA к *Chlamydia trachomatis* определяется путем сравнения ОП образца с ОП Cut-off контроля.

Образцы с ОП ниже ОП Cut-off контроля признают не содержащими антитела класса IgA к антигену *Chlamydia*.

Образцы с ОП выше ОП Cut-off контроля признают содержащими антитела класса IgA к антигену *Chlamydia*.

Область значений ОП $\pm 10\%$ от ОП Cut-off контроля является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требует повторного исследования для подтверждения.

9.1. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

	Условие
Отрицательный контроль	< 0,200
Положительный контроль	> 0,700

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.2. Интерпретация результатов

Результат определяется как отношение ОП образца к ОП Cut-off контроля. Эта величина называется индексом.

$$\text{Индекс} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП Cut-off контроля}}$$

– Образцы с Индексом < 0,9 признают отрицательными по содержанию антител класса IgA к антигену *Chlamydia*.

– Образцы с Индексом > 1,1 признают положительными по содержанию антител класса IgA к антигену *Chlamydia*.

– Образцы с Индексом 0,9 – 1,1 (ОП $\pm 10\%$ от Cut-off контроля) считаются сомнительными и требуют повторного тестирования.

Результаты анализа нескольких образцов, полученных от одного пациента с промежутком времени, допускается сравнивать между собой только в том случае, если все образцы были исследованы в одном и том же анализе. В этом случае изменение ОП во втором образце более чем на 60% можно считать

существенным признаком недавней или прогрессирующей инфекции. В этом случае рекомендуется исследовать образец на содержание специфических антител класса IgG.

9.3. Пример подсчета

Нижеследующие данные приведены исключительно в качестве примера. Не следует использовать эти величины вместо подлинных экспериментальных данных.

	ОП при 450 нм	IgA	Индекс
Отрицательный контроль	0.082		
Cut-off контроль	0.504		
Положительный контроль	1.992		
Образец	0.889	+	1.76

Исследуемый образец признается положительным (+) по содержанию антител класса IgA к антигену *Chlamydia*.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

При определении у пациента уровня иммунитета к *Chlamydia* наличие антител класса IgG в любой концентрации не исключает возможности наличия инфекции в настоящий момент. Следовательно, для раннего выявления случаев острой инфекции необходимо определение специфических антител класса IgA. В случае выявления заболевания своевременная медицинская помощь существенно снижает риск отрицательных последствий. Однако, результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:300

Реагенты	Blank	Контроли	Исследуемые образцы
Контроли NEG POS C/O	-----	100 мкл	-----
Исследуемые образцы	-----	-----	100 мкл
Раствор для разведения DIL	100 мкл	-----	-----

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат CONJ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 30±2 мин.
- Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: А: 37±2°C, 10 мин; или В: комнатная температура 15 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------

Определение ОП при 450 - 405 нм.

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 3. (2211) листов

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев

**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G K
CHLAMYDIA PNEUMONIAE В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
Chlamydia pneumoniae IgG**

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Chlamydia - неподвижный, грамотрицательный облигатный внутриклеточный паразит, который формирует характерные включения в цитоплазме инфицированных клеток. Хламидии легко различимы в световой микроскоп. Известны 3 патогенных для человека вида Chlamydia: Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae и Chlamydia psittaci и один вид, который патогенен только для животных (Chlamydia pecorum).

Chlamydia trachomatis - наиболее распространенная причина заболеваний, передающихся половым путем, количество заболевших по всему миру людей оценивается 400-500 миллионами и эта цифра постоянно растет. У новорожденных, которые могут заразиться во время прохождения по родовым путям матери больной хламидиозом, C. trachomatis может вызвать конъюнктивит или пневмонию. Нелеченые случаи хламидийной инфекции могут привести к хроническому сальпингиту, который может стать причиной внематочной беременности или бесплодия. У мужчин C. trachomatis в большинстве случаев вызывает негонорейный уретрит. Хламидийная инфекция часто протекает бессимптомно, что является большой проблемой, так как может привести к возникновению хронических заболеваний. Во многих случаях удается диагностировать заболевания, являющиеся последствием инфекции, в то время как первичное инфицирование остается нераспознанным.

Вид	Механизм передачи инфекции	Заболевания	Методы диагностики
C. trachomatis	Прямой или половой путь передачи Очаги инфекции: обычно слизистая глаз или мочеполовой системы	Венерическая лимфогранулема; трахома; конъюнктивит с включениями; цервицит; сальпингит; уретрит; эпидидимит; проктит и пневмония новорожденных	ПЦР Серологические методы Микроскопические методы
C. pneumoniae	Проникают через слизистую дыхательной системы	Поражение дыхательной системы Возможно: эндокардит, коронарная болезнь	
C. psittaci	Вдыхание пыли, содержащей частички испражнений инфицированных птиц Контакт с внутренними органами инфицированных птиц	Орнитоз (Пситтакоз)	

Для диагностики инфекции могут быть использованы следующие методы:

- Микроскопический анализ: окраска по Романовскому-Гимзе
- ПЦР
- Серологическое исследование:
Определение антигенов методом ИФА
Определение антител методами иммунофлюоресценции и ИФА.

Тест-система Chlamydia pneumoniae IgG предназначена для качественного и полуколичественного определения иммуноглобулинов класса G против Chlamydia pneumoniae в сыворотке и плазме (цитратная) крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип действия данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела против *Chlamydia pneumoniae* (если они есть в образце) связываются с антигеном *C. pneumoniae*, адсорбированным на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение следующей инкубации антитела против IgG человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом антиген *C. pneumoniae* – антитело. После цикла промывок в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание специфических антител класса IgG в образцах и контролях прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет MTP	1x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Конс.
Раствор для разведения DIL	1 x 105 мл	Готов к использованию Ready for use
Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Контроль Cut-off C/O	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Положительный контроль POS	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 20 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет **MTP** / Coated microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок), лунки стрипов планшета покрыты антигеном *Chlamydia pneumoniae*. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете.
- **Раствор для разведения **DIL** / Sample Diluent IgG:** – 1 флакон. Фосфатный буферный раствор желтого цвета, pH 7,2±0,2. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.
- **Промывочный раствор 20x **WASH** / Washing Solution (20x):** – 1 флакон. Консервант: 0,2% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместить раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C).
- **Конъюгат **CONJ** / Enzyme Conjugate:** – 1 флакон. Раствор розового цвета со стабилизаторами, содержит кроличьи антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO). Готов к использованию. Консервант: 0,2% Бронидокс L.
- **Положительный контроль **POS** / Positive Control:** – 1 флакон. Раствор желтого цвета. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.
- **Контроль Cut-off **C/O** / Cut-off Control:** – 1 флакон. Раствор желтого цвета. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.
- **Отрицательный контроль **NEG** / Negative Control:** – 1 флакон. Раствор желтого цвета. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.

- **Раствор ТМБ (ТМВ):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - способность метода определять образцы, не содержащие специфический аналит, как отрицательные. Специфичность составляет 91,7%.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - способность метода определять образцы, содержащие специфический аналит, как положительные. Чувствительность составляет 90,2%.

3.3 Прецизионность

Прецизионность оценивалась посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации).

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Образец	Кол-во измерений	Уровень специфических IgG, EP	KB, %
Положительная сыворотка	12	9	10,6
Положительная сыворотка	12	32	5,2

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Образец	Кол-во измерений	Оптическая плотность, ед.опт.пл.	KB, %
Положительная сыворотка	20	0,41	7,2
Положительная сыворотка	24	1,37	4,3

3.4 Интерференция

Интерференция гемоглобина, триглицеридов и билирубина не обнаружена вплоть до концентраций 10 мг/мл, 5 мг/мл и 0,2 мг/мл соответственно.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты разных серий набора (см.п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.

- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.

- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.

- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.

- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.

- Не разрешается пипетировать ртом.

- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирачный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.

- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.

- Дистиллированная вода.

- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и цитратной плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 5 суток. При необходимости более длительного хранения образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:101 с помощью Раствора для разведения (см. п.2.2.1). Например: 10 мкл образца + 1000 мкл раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры (+18...25°C).

– Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank), 1 лунку для Отрицательного контроля, 2 лунки для контроля Cut-off и одну лунку для Положительного контроля.

7.2. Внесите по 100 мкл контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60±5 минут при 37±1°C.

7.4. Удалите содержимое лунок и промойте их 3 раза, внося при каждой промывке по 300 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.5. Внесите во все лунки, исключая лунку Blank, по 100 мкл Конъюгата.

7.6. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 30±2 минут при 20...25°C.

7.7. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.4).

7.8. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.

Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (+18...25°C) в темноте.

7.9. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание:

- 1) При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.
- 2) В высокоположительных образцах, в следствие очень интенсивной окраски, ТМБ может осаждаться на стенках лунок планшета, что приведет к невозможности адекватно измерить оптическую плотность. В этом случае, перед разведением образцов буфером для разведения, рекомендуется развести их в 2 раза физиологическим раствором. При анализе результатов таких образцов необходимо помнить, что полученное значение в ОП должно быть умножено на 2.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Анализ результатов (качественный метод)

Определите оптическую плотность (ОП) Контроля Cut-off. Найдите среднее значение ОП для Контроля Cut-off. Присутствие или отсутствие антител класса IgG против Chlamydia pneumoniae определяется путем сравнения ОП образца с ОП_{ср.} Контроля Cut-off.

Образцы с ОП ниже ОП Контроля Cut-off – 10% признают нереактивными (не содержащими антитела класса IgG против Chlamydia pneumoniae).

Образцы с ОП выше ОП Контроля Cut-off + 10% признают реактивными (содержащими антитела класса IgG против Chlamydia pneumoniae).

Область значений ОП ± 10% от ОП Контроля Cut-off является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным. Рекомендуется повторить анализ через 2 – 4 недели, получив для этого свежий образец сыворотки или плазмы. Если результат повторного теста также окажется сомнительным, то образец следует признать отрицательным.

9.2. Анализ результатов (полуколичественный метод)

Определите оптическую плотность (ОП) Контроля Cut-off. Найдите среднее значение оптической плотности для Контроля Cut-off. Для каждого образца рассчитать коэффициент в единицах RADIM (EP) по формуле 1:

$$\text{ОП образца} \times 10 / \text{ОП}_{\text{ср. Cut-off}} \quad (1)$$

Образцы с коэффициентом ниже 9 EP признают нереактивными (не содержащими антитела класса IgA против Chlamydia pneumoniae).

Образцы с коэффициентом выше 11 ЕР признают реактивными (содержащими антитела класса IgA против *Chlamydia pneumoniae*).

Область значений коэффициента 9 – 11 ЕР является областью сомнительных значений. Если коэффициент для образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным. Рекомендуется повторить анализ через 2 – 4 недели, получив для этого свежий образец сыворотки или плазмы. Если результат повторного теста также окажется сомнительным, то образец следует признать отрицательным.

9.3. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

Описание	Условие
Blank	< 0,100
Отрицательный контроль	< 0,200
Контроль Cut-off	0,250-0,900
Положительный контроль	≥ ОП Cut-off

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.4. Интерпретация результатов

– Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию антител IgG класса против *Chlamydia pneumoniae*.

– Реактивные и сомнительные образцы признают положительными по содержанию антител IgG класса против *Chlamydia pneumoniae*.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Бактериальная контаминация и повторная заморозка/разморозка могут сказаться на оптической плотности образцов. Поэтому постановка диагноза не должна основываться на единичном лабораторном исследовании, следует принимать во внимание анамнез и результаты исследования другими методами. У пациентов с иммуносупрессией и новорожденных данные серологического исследования должны интерпретироваться с осторожностью.

Антиген *Chlamydia pneumoniae*, сорбированный в лунках, представляет собой структурные элементы наружной мембраны. Для сывороток, содержащих антитела против LPS и MOMP *Chlamydia trachomatis*, возможен ложноположительный результат.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:101

Реагенты \ Лунки	Blank	NEG	C/O	POS	Образцы (разведенные в 101 раз)
NEG	-----	100 мкл	-----	-----	-----
C/O	-----	-----	100 мкл	-----	-----
POS	-----	-----	-----	100 мкл	-----
Образцы (разведенные в 101 раз)	-----	-----	-----	-----	100 мкл

- Инкубация: 37±1°C, 60±5 мин.
- Промывка: 3 x 300 мкл.

Конъюгат CONJ	----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
---------------	------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 20...25°C, 30±2 мин.
- Промывка: 3 x 300 мкл

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: комнатная температура, 15 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм).

еральный директор
О «Компания Алкор Био»

ководитель лаборатории разработки ИФА-систем
О «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

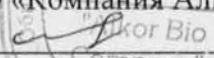
Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 7 (семь) лист 06

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
 М.В. Швырев



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ
 ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ А К
 CHLAMYDIA PNEUMONIAE В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
 Chlamydia pneumoniae IgA**

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Chlamydia - неподвижный, грамотрицательный облигатный внутриклеточный паразит, который формирует характерные включения в цитоплазме инфицированных клеток. Хламидии легко различимы в световой микроскоп. Известны 3 патогенных для человека вида Chlamydia: Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae и Chlamydia psittaci и один вид, который патогенен только для животных (Chlamydia pecorum).

Chlamydia trachomatis - наиболее распространенная причина заболеваний, передающихся половым путем, количество заболевших по всему миру людей оценивается 400-500 миллионами и эта цифра постоянно растет. У новорожденных, которые могут заразиться во время прохождения по родовым путям матери больной хламидиозом, C. trachomatis может вызвать конъюнктивит или пневмонию. Нелеченые случаи хламидийной инфекции могут привести к хроническому сальпингиту, который может стать причиной внематочной беременности или бесплодия. У мужчин C. trachomatis в большинстве случаев вызывает негонорейный уретрит. Хламидийная инфекция часто протекает бессимптомно, что является большой проблемой, так как может привести к возникновению хронических заболеваний. Во многих случаях удается диагностировать заболевания, являющиеся последствием инфекции, в то время как первичное инфицирование остается нераспознанным.

Вид	Механизм передачи инфекции	Заболевания	Методы диагностики
C. trachomatis	Прямой или половой путь передачи Очаги инфекции: обычно слизистая глаз или мочеполовой системы	Венерическая лимфогранулема; трахома; конъюнктивит с включениями; цервицит; сальпингит; уретрит; эпидидимит; проктит и пневмония новорожденных	ПЦР Серологические методы Микроскопические методы
C. pneumoniae	Проникают через слизистую дыхательной системы	Поражение дыхательной системы Возможно: эндокардит, коронарная болезнь	
C. psittaci	Вдыхание пыли, содержащей частички испражнений инфицированных птиц Контакт с внутренними органами инфицированных птиц	Орнитоз (Пситтакоз)	

Для диагностики инфекции могут быть использованы следующие методы:

- Микроскопический анализ: окраска по Романовскому-Гимзе
- ПЦР
- Серологическое исследование:
 Определение антигенов методом ИФА
 Определение антител методами иммунофлюоресценции и ИФА.

Тест-система Chlamydia pneumoniae IgA предназначена для качественного и полуколичественного определения иммуноглобулинов класса А против Chlamydia pneumoniae в сыворотке крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип действия данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела против *Chlamydia pneumoniae* (если они есть в образце) связываются с антигеном *C. pneumoniae*, адсорбированным на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение следующей инкубации антитела против IgA человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом антиген *C. pneumoniae* – антитело. После цикла промывок в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание специфических антител класса IgA в образцах и контролях прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет MTP	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Conc.
Раствор для разведения DIL	1 x 105 мл	Готов к использованию Ready for use
Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Контроль Cut-off C/O	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Положительный контроль POS	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 20 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет **MTP** / *Chlamydia pneumoniae* Coated microplate (IgA):** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок), лунки стрипов планшета покрыты антигеном *Chlamydia pneumoniae*. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...+8°C в плотно закрытом пластиковом пакете.
- **Раствор для разведения **DIL** / IgA Sample Diluent:** – 1 флакон. Фосфатный буферный раствор желтого цвета, pH 7,2±0,2. Готов к использованию. Консерванты: 0,095% азид натрия и 0,1% Катон GC.
- **Промывочный раствор 20x **WASH** / Washing Solution (20x):** – 1 флакон. Консервант: 0,2% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместить раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 5 суток при комнатной температуре (+18...+25°C).
- **Конъюгат **CONJ** / *Chlamydia pneumoniae* anti-IgA Conjugate:** – 1 флакон. Раствор розового цвета со стабилизаторами, содержит кроличьи антитела к IgA человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO). Готов к использованию. Консервант: 0,2% Бронидокс L.
- **Положительный контроль **POS** / *Chlamydia pneumoniae* IgA Positive Control:** – 1 флакон. Раствор желтого цвета. Готов к использованию. Консервант: 0,095% азид натрия и 0,1% Катон GC.
- **Контроль Cut-off **C/O** / *Chlamydia pneumoniae* IgA Cut-off Control:** – 1 флакон. Раствор желтого цвета. Готов к использованию. Консервант: 0,095% азид натрия и 0,1% Катон GC.

- **Отрицательный контроль [NEG] / Chlamydia pneumoniae IgA Negative Control:** – 1 флакон. Раствор желтого цвета. Готов к использованию. Консерванты: 0,095% азид натрия и 0,1% Катон GC.
- **Раствор ТМБ (ТМВ):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - способность метода определять образцы, не содержащие специфический аналит, как отрицательные. Специфичность составляет > 95%.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - способность метода определять образцы, содержащие специфический аналит, как положительные. Чувствительность составляет 88,9%.

3.3 Прецизионность

Прецизионность оценивалась посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации).

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Образец	Кол-во измерений	Уровень специфических IgA, ЕР	КВ, %
Положительная сыворотка	12	22,2	9,7
Положительная сыворотка	12	16,3	14,0

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Образец	Кол-во измерений	Оптическая плотность, ед.опт.пл.	КВ, %
Положительная сыворотка	20	1,20	4,9
Положительная сыворотка	24	0,84	8,3

3.4 Интерференция

Интерференция гемоглобина, триглицеридов и билирубина не обнаружена вплоть до концентраций 10 мг/мл, 5 мг/мл и 0,2 мг/мл соответственно.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты разных серий набора (см.п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.

- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
 - Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
 - Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
 - Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
 - Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.
- Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:**
- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
 - Не разрешается пипетировать ртом.
 - Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
 - Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
 - Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
 - Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
 - Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки крови человека. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 24 часов. При необходимости более длительного хранения образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:101 с помощью Раствора для разведения (см. п.2.2.). Например: 10 мкл образца + 1000 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры (+18...25°C).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank), 1 лунку для Отрицательного контроля, 2 лунки для контроля Cut-off и одну лунку для Положительного контроля.

7.2. Внесите по 100 мкл контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60±5 минут при 37±2°C.

7.4. Удалите содержимое лунок и промойте их 3 раза, внося при каждой промывке по 300 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.5. Внесите во все лунки, исключая лунку Blank, по 100 мкл Конъюгата.

7.6. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 30±2 минут при 20...25°C.

7.7. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.4.).

7.8. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.

Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (+18...25°C) в темноте.

7.9. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводить при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание:

- 1) При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.
- 2) В высокоположительных образцах, в следствие очень интенсивной окраски, ТМБ может оседать на стенках лунок планшета, что приведет к невозможности адекватно измерить оптическую плотность. В этом случае, перед разведением образцов буфером для разведения, рекомендуется развести их в 2 раза физиологическим раствором. При анализе результатов таких образцов необходимо помнить, что полученное значение в EP должно быть умножено на 2.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов (качественный метод)

Определить оптическую плотность (ОП) Контроля Cut-off. Найти среднее значение ОП для Контроля Cut-off. Присутствие или отсутствие антител класса IgA против *Chlamydia pneumoniae* определяется путем сравнения ОП образца с ОПср. Контроля Cut-off.

Образцы с ОП ниже ОП Контроля Cut-off – 10% признают нереактивными (не содержащими антитела класса IgA против *Chlamydia pneumoniae*).

Образцы с ОП выше ОП Контроля Cut-off + 10% признают реактивными (содержащими антитела класса IgA против *Chlamydia pneumoniae*).

Область значений ОП ± 10% от ОП Контроля Cut-off является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным. Рекомендуется повторить анализ через 2 – 4 недели, получив для этого свежий образец сыворотки крови. Если результат повторного теста также окажется сомнительным, то образец следует признать отрицательным.

9.2. Анализ результатов (полуколичественный метод)

Определить оптическую плотность (ОП) Контроля Cut-off. Найти среднее значение ОП для Контроля Cut-off. Для каждого образца рассчитать коэффициент в единицах RADIM (EP) по формуле 1:

$$\text{ОП}_{\text{образца}} \times 10 / \text{ОПср. Cut-off} \quad (1)$$

Образцы с коэффициентом ниже 9 ЕР признают нереактивными (не содержащими антитела класса IgA против *Chlamydia pneumoniae*).

Образцы с коэффициентом выше 11 ЕР признают реактивными (содержащими антитела класса IgA против *Chlamydia pneumoniae*).

Область значений коэффициента 9 – 11 ЕР является областью сомнительных значений. Если коэффициент для образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным. Рекомендуется повторить анализ через 2 – 4 недели, получив для этого свежий образец сыворотки крови. Если результат повторного теста также окажется сомнительным, то образец следует признать отрицательным.

9.3. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

Описание	Условие
Blank	< 0,100
Отрицательный контроль	< 0,200
Контроль Cut-off	0,250-0,900
Положительный контроль	≥ ОП Cut-off

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.4. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию антител IgA класса против *Chlamydia pneumoniae*.
- Реактивные и сомнительные образцы признают положительными по содержанию антител IgA класса против *Chlamydia pneumoniae*.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Бактериальная контаминация и повторная заморозка/разморозка могут сказаться на оптической плотности образцов. Поэтому постановка диагноза не должна основываться на единичном лабораторном исследовании, следует принимать во внимание анамнез и результаты исследования другими методами. У пациентов с иммуносупрессией и новорожденных данные серологического исследования должны интерпретироваться с осторожностью.

Антиген *Chlamydia pneumoniae*, сорбированный в лунках, представляет собой структурные элементы наружной мембраны. Для сывороток, содержащих антитела против LPS и MOMP *Chlamydia trachomatis*, возможен ложноположительный результат.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:101

Реагенты \ Лунки	Blank	NEG	C/O	POS	Образцы (разведенные в 101 раз)
NEG	-----	100 мкл	-----	-----	-----
C/O	-----	-----	100 мкл	-----	-----
POS	-----	-----	-----	100 мкл	-----
Образцы (разведенные в 101 раз)	-----	-----	-----	-----	100 мкл

- Инкубация: 37±1°C, 60±5 мин.
- Промывка: 3 x 300 мкл.

Конъюгат CONJ	----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
---------------	------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 20...25°C, 30±2 мин.
- Промывка: 3 x 300 мкл

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: комнатная температура, 15 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм)

альный директор
«Компания Алкор Био»

одитель лаборатории разработки ИФА-систем
«Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 7 (силь) лист 06

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



«УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

«12»

января

2011г

**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М К
CHLAMYDIA PNEUMONIAE В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
Chlamydia pneumoniae IgM**

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Chlamydia - неподвижный, грамтрицательный облигатный внутриклеточный паразит, который формирует характерные включения в цитоплазме инфицированных клеток. Хламидии легко различимы в световой микроскоп. Известны 3 патогенных для человека вида Chlamydia: Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae и Chlamydia psittaci и один вид, который патогенен только для животных (Chlamydia pecorum).

Chlamydia trachomatis - наиболее распространенная причина заболеваний, передающихся половым путем, количество заболевших по всему миру людей оценивается 400-500 миллионами и эта цифра постоянно растет. У новорожденных, которые могут заразиться во время прохождения по родовым путям матери больной хламидиозом, C. trachomatis может вызвать конъюнктивит или пневмонию. Нелеченые случаи хламидийной инфекции могут привести к хроническому сальпингиту, который может стать причиной внематочной беременности или бесплодия. У мужчин C. trachomatis в большинстве случаев вызывает негонорейный уретрит. Хламидийная инфекция часто протекает бессимптомно, что является большой проблемой, так как может привести к возникновению хронических заболеваний. Во многих случаях удается диагностировать заболевания, являющиеся последствием инфекции, в то время как первичное инфицирование остается нераспознанным.

Вид	Механизм передачи инфекции	Заболевания	Методы диагностики
C. trachomatis	Прямой или половой путь передачи Очаги инфекции: обычно слизистая глаз или мочеполовой системы	Венерическая лимфогранулема; трахома; конъюнктивит с включениями; цервицит; сальпингит; уретрит; эпидидимит; проктит и пневмония новорожденных	ПЦР Серологические методы Микроскопические методы
C. pneumoniae	Проникают через слизистую дыхательной системы	Поражение дыхательной системы Возможно: эндокардит, коронарная болезнь	
C. psittaci	Вдыхание пыли, содержащей частички испражнений инфицированных птиц Контакт с внутренними органами инфицированных птиц	Орнитоз (Пситтакоз)	

Для диагностики инфекции могут быть использованы следующие методы:

- Микроскопический анализ: окраска по Романовскому-Гимзе
- ПЦР
- Серологическое исследование:
Определение антигенов методом ИФА
Определение антител методами иммунофлюоресценции и ИФА.

Тест-система Chlamydia pneumoniae IgM предназначена для качественного и полуколичественного определения иммуноглобулинов класса М против Chlamydia pneumoniae в сыворотке и плазме (цитратной) крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип действия данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела против *Chlamydia pneumoniae* (если они есть в образце) связываются с антигеном *C. pneumoniae*, адсорбированным на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение следующей инкубации антитела против IgM человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом антиген *C. pneumoniae* – антитело. После цикла промывок в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание специфических антител класса IgM в образцах и контролях прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет MTP	1x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Conc.
Раствор для разведения DIL	1 x 105 мл	Готов к использованию Ready for use
Отрицательный контроль NEG	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Контроль Cut-off C/O	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Положительный контроль POS	1 x 2 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 20 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет **MTP** / Coated microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок), лунки стрипов планшета покрыты антигеном *Chlamydia pneumoniae*. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете.
- **Раствор для разведения **DIL** / Sample Diluent IgM:** – 1 флакон. Фосфатный буферный раствор зеленого цвета, содержит антитела к IgG человека, pH 7,2±0,2. Готов к использованию. Консервант: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.
- **Промывочный раствор 20x **WASH** / Washing Solution (20x):** – 1 флакон. Консервант: 0,2% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместить раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C).
- **Конъюгат **CONJ** / Enzyme Conjugate:** – 1 флакон. Раствор розового цвета со стабилизаторами, содержит кроличьи антитела к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO). Готов к использованию. Консервант: 0,2% Бронидокс L.
- **Положительный контроль **POS** / Positive Control:** – 1 флакон. Раствор желтого цвета. Готов к использованию. Консервант: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.
- **Контроль Cut-off **C/O** / Cut-off Control:** – 1 флакон. Раствор желтого цвета. Готов к использованию. Консервант: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.

- **Отрицательный контроль NEG / Negative Control:** – 1 флакон. Раствор желтого цвета. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.
- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - способность метода определять образцы, не содержащие специфический аналит, как отрицательные. Специфичность составляет > 95%.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - способность метода определять образцы, содержащие специфический аналит, как положительные. Чувствительность составляет 83,3%.

3.3 Прецизионность

Прецизионность оценивалась посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации).

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Образец	Кол-во измерений	Уровень специфических IgA, EP	KB, %
Положительная сыворотка	12	21,6	8,25

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Образец	Кол-во измерений	Оптическая плотность, ед.опт.пл.	KB, %
Положительная сыворотка	20	1,16	4,01

3.4 Интерференция

Интерференция гемоглобина, триглицеридов и билирубина не обнаружена вплоть до концентраций 10 мг/мл, 5 мг/мл и 0,2 мг/мл соответственно.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты разных серий набора (см.п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.

– Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.

– Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.

– Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.

– Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

– При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.

– Не разрешается пипетировать ртом.

– Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

– Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

– Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

– Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

– Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и цитратной плазмы крови человека. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 5 суток. При необходимости более длительного хранения образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:101 с помощью Раствора для разведения (см. п.2.2.1). Например: 10 мкл образца + 1000 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры (+18...25°C).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank), 1 лунку для Отрицательного контроля, 2 лунки для контроля Cut-off и одну лунку для Положительного контроля.

7.2. Внесите по 100 мкл контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 60±5 минут при 37±2°C.

7.4. Удалите содержимое лунок и промойте их 3 раза, внося при каждой промывке по 300 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.5. Внесите во все лунки, исключая лунку Blank, по 100 мкл Конъюгата.

7.6. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора) и инкубируйте его в течение 30±2 минут при 20...25°C.

7.7. Удалите содержимое лунок и промойте планшет (см. п.7.4).

7.8. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.

Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (+18...25°C) в темноте.

7.9. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание:

- 1) При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.
- 2) В высокоположительных образцах, в следствие очень интенсивной окраски, ТМБ может осаждаться на стенках лунок планшета, что приведет к невозможности адекватно измерить оптическую плотность. В этом случае, перед разведением образцов буфером для разведения, рекомендуется развести их в 2 раза физиологическим раствором. При анализе результатов таких образцов необходимо помнить, что полученное значение в EP должно быть умножено на 2.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов (качественный метод)

Определите оптическую плотность (ОП) Контроля Cut-off. Найдите среднее значение ОП для Контроля Cut-off. Присутствие или отсутствие антител класса IgM против Chlamydia pneumoniae определяется путем сравнения ОП образца с ОП_{ср.} Контроля Cut-off.

Образцы с ОП ниже ОП Контроля Cut-off – 10% признают нереактивными (не содержащими антитела класса IgM против Chlamydia pneumoniae).

Образцы с ОП выше ОП Контроля Cut-off + 10% признают реактивными (содержащими антитела класса IgM против Chlamydia pneumoniae).

Область значений ОП ± 10% от ОП Контроля Cut-off является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным. Рекомендуется повторить анализ через 2 – 4 недели, получив для этого свежий образец сыворотки или плазмы. Если результат повторного теста также окажется сомнительным, то образец следует признать отрицательным.

9.2. Анализ результатов (полуколичественный метод)

Определите оптическую плотность (ОП) Контроля Cut-off. Найдите среднее значение ОП для Контроля Cut-off. Для каждого образца рассчитать коэффициент в единицах RADIM (EP) по формуле 1:

$$\frac{\text{ОП}_{\text{образца}} \times 10}{\text{ОП}_{\text{ср. Cut-off}}} \quad (1)$$

Образцы с коэффициентом ниже 9 EP признают нереактивными (не содержащими антитела класса IgM против Chlamydia pneumoniae).

Образцы с коэффициентом выше 11 EP признают реактивными (содержащими антитела класса IgM против Chlamydia pneumoniae).

Область значений коэффициента 9 – 11 ЕР является областью сомнительных значений. Если коэффициент для образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным. Рекомендуется повторить анализ через 2 – 4 недели, получив для этого свежий образец сыворотки или плазмы. Если результат повторного теста также окажется сомнительным, то образец следует признать отрицательным.

9.3. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

Описание	Условие
Blank	< 0,100
Отрицательный контроль	< 0,200
Контроль Cut-off	0,250-0,900
Положительный контроль	≥ ОП Cut-off

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.4. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию антител IgM класса против *Chlamydia pneumoniae*.
- Реактивные и сомнительные образцы признают положительными по содержанию антител IgM класса против *Chlamydia pneumoniae*.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Бактериальная контаминация и повторная заморозка/разморозка могут сказаться на оптической плотности образцов. Поэтому постановка диагноза не должна основываться на единичном лабораторном исследовании, следует принимать во внимание анамнез и результаты исследования другими методами. У пациентов с иммуносупрессией и новорожденных данные серологического исследования должны интерпретироваться с осторожностью.

Антиген *Chlamydia pneumoniae*, сорбированный в лунках, представляет собой структурные элементы наружной мембраны. Для сывороток, содержащих антитела против LPS и MOMP *Chlamydia trachomatis*, возможен ложноположительный результат.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:101

Реагенты \ Лунки	Blank	NEG	C/O	POS	Образцы (разведенные в 101 раз)
NEG	-----	100 мкл	-----	-----	-----
C/O	-----	-----	100 мкл	-----	-----
POS	-----	-----	-----	100 мкл	-----
Образцы (разведенные в 101 раз)	-----	-----	-----	-----	100 мкл

- Инкубация: 37±2°C, 60±5 мин.
- Промывка: 3 x 300 мкл.

Конъюгат CONJ	----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
---------------	------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 20...25°C, 30±2 мин.
- Промывка: 3 x 300 мкл

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: комнатная температура, 15 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм).

генеральный директор

О «Компания Алкор Био»

Производитель лаборатории разработки ИФА-систем
О «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

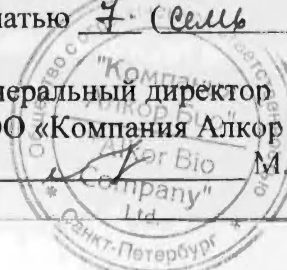
info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 7 (семь) листов

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Швырев М.В.
« 12 » _____ 2011г



БЕЛОК А ИЗ STAPHYLOCOCCUS AUREUS PROTEIN-A

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Ревматоидный фактор - это один из интерферирующих агентов для тест-систем, предназначенных для определения специфических IgM. Он представляет собой антитела класса M, направленные против собственных иммуноглобулинов класса G. Во время анализа они могут взаимодействовать с IgG, которые присутствуют в анализируемой пробе. Подобная проблема не характерна для тест-систем реализованных в «capture» формате, но в остальных наборах, образец, для которого был получен положительный результат, должен быть обработан белком А и проанализирован повторно. Белок А необратимо связывается с IgG и удаляет их из образца. Подобная обработка препятствует возникновению ложноположительных результатов, обусловленных ревматоидным фактором.

Белок А выделяют из *Staphylococcus aureus* (штамм Cowan I).

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕАГЕНТА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип действия Protein-A основан на его способности необратимо связывать иммуноглобулины класса G. Таким образом, предварительной обработкой исследуемых образцов Protein-A можно уменьшить количество ложноположительных результатов в тест-системах для определения IgM.

2.2. СОСТАВ

1 флакон. Содержит суспензию *Staphylococcus aureus* (штамм Cowan I). Консервант: азид натрия (<0,1%). Лиофилизирован. Перед использованием растворить содержимое флакона в 1 мл дистиллированной воды, до получения гомогенной суспензии. Добавить 1,5 мл физиологического раствора. Приготовленную таким образом суспензию хранить 10 дней при +2...8°C. Количества достаточно для обработки 12 образцов.

3. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

3.1. Смешайте 250 мкл суспензии Белка А с 25 мкл анализируемого образца. Аккуратно перемешайте.

3.2. Инкубируйте в течение **30 минут при комнатной температуре, перемешивая через каждые 10 минут.**

3.3. Центрифугируйте в течение 10 минут при 3000 об/мин.

3.4. Полученный супернатант можно использовать для проведения анализа.

Примечание: Необходимо помнить, что в результате обработки образец разводится 1:10. Поэтому при необходимости предварительного разведения образца для анализа коэффициент разведения должен быть уменьшен.

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 2 (два) лист а

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

М.В. Швырев



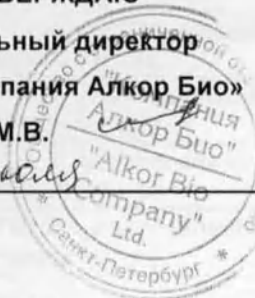
«УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 11 » *Июль* 2011г



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА «Е» ВИРУСА ГЕПАТИТА В И/ИЛИ АНТИТЕЛ
К АНТИГЕНУ «Е»ВИРУСА ГЕПАТИТА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
HBeAg&Ab**

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Определение антигена «е» вируса гепатита В (HBeAg) и антител против HBeAg (анти-HBe) играет важную роль при мониторинге ВГВ инфекции. Присутствие HBeAg в сыворотке крови говорит об активной репликации вируса. Этот антиген позволяет наблюдать за развитием инфекционного процесса и спрогнозировать течение инфекции. С другой стороны, присутствие антител к HBeAg говорит о снижении репликативной активности ВГВ. Определение анти-HBe очень полезно при мониторинге сероконверсии у пациентов с острой ВГВ инфекцией и определении активности инфекционного процесса у пациентов с хроническим гепатитом В.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе реагентов реализовано 2 варианта иммуноферментного анализа.

HBeAg определяют с помощью «сэндвич»-варианта твердофазного ИФА с использованием антител к HBeAg, которые иммобилизованы на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок) и конъюгированы с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата антител с пероксидазой, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация антигена, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации антигеном. Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству антигена в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках наличие соответствующего антигена оценивается относительно значения cut-off.

Антитела к HBeAg определяют методом конкурентного ИФА. Во время инкубации в лунках, при добавлении исследуемого образца, нейтрализующего раствора, содержащего рекомбинантный HBeAg и антител к HBeAg, конъюгированных с пероксидазой хрена, происходит связывание HBeAg с иммобилизованными антителами и конкуренция за связывание с образовавшимся комплексом конъюгированных антител и антигенов, содержащихся в исследуемом образце. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна количеству антител к HBeAg в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках наличие специфических антител оценивают относительно значения cut-off.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет MTP	1x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Conc.
Отрицательный контроль NEG	1 x 3,0 мл	Готов к использованию Ready for use
HbeAg Положительный контроль POS Ag	1 x 1,0 мл	Готов к использованию Ready for use
HBeAb Положительный контроль POS Ab	1 x 1,0 мл	Готов к использованию Ready for use
Нейтрализующий раствор	1 флакон	Лиофилизированный препарат

NEUT		Lyoph.
Дилуент для нейтрализующего раствора DIL NEUT	1 x 5,0 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (МТР) / Coated microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок), лунки стрипов планшета покрыты моноклональными антителами к HBeAg. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

- **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, отрицательный по отношению ко всем маркерам гепатита В и не содержащий антитела к вирусу гепатита С и ВИЧ. Консервант: неомицин. Готов к использованию.

- **HBeAg Положительный контроль (POS Ag) / HBeAg Positive Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, содержит HBeAg и не содержит HBsAg и антитела к вирусу гепатита С и ВИЧ. Консервант: неомицин. Готов к использованию.

- **HBeAb Положительный контроль (POS Ab) / HBeAb Positive Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, содержит антитела к HBeAg и не содержит HBsAg и антитела к вирусу гепатита С и ВИЧ. Консервант: неомицин. Готов к использованию.

- **Нейтрализующий раствор (NEUT) / Neutralizing Solution (HBeAg):** 1 флакон. Содержит HBeAg и БСА. Лиофилизирован. Перед использованием растворите содержимое флакона в 5 мл дилуента для нейтрализующего раствора. Восстановленный реагент хранить не более 7 суток при температуре +2...8°C или более длительный срок при -20°C. Повторное замораживание не допускается. Консервант: неомицин.

- **Дилуент для Нейтрализующего раствора (DIL NEUT) / Neutralizing Diluent:** 1 флакон. Раствор на основе трисового буфера содержит БСА. Консервант: неомицин. Готов к использованию.

- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон. Раствор на основе трисового буфера содержит моноклональные антитела к HBeAg, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO). Консервант: неомицин. Готов к использованию.

- **Промывочный раствор (WASH) / Washing Solution (concentrated):** 1 флакон. Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: Тимеросал (< 0.05%). Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:10. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C. **Реагент общий для продуктов линий «HEPATITIS B» производства компании RADIM.**

- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.

- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.

- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**

- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе более 500 образцов, полученных от доноров крови и пациентов не имеющих ВГВ инфекции. Специфичность составляет ≥ 98%.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе более 200 положительных образцов. Чувствительность составляет ≥ 98%.

3.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матриксе образца. Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина), аутоантител или родственных вирусов.

3.4 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность – это минимальное количество специфического анализата, определяемого при анализе. Она определялась с помощью референсной панели, полученной из института Пауля Эрлиха. Для HbeAg она составила 0,5 МЕ/мл, а для HbeAb – 0,6 МЕ/мл.

3.5 Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией HbeAg и антител против HbeAg. Для того чтобы перевести качественный результат в количественный параметр, оптическую плотность (ОП), полученную для образцов, делили на значение Cut-off, получая, таким образом, значение S/CO (сигнал/ Cut-off).

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Анти-HBe

Сыворотка	Среднее значение	±	S.D.	C.V.	Кол-во репликаторов
				%	
a	1,64	±	0,09	5,4	10
b	1,11	±	0,09	7,9	10
c	0,79	±	0,07	9,0	10

HbeAg

Сыворотка	Среднее значение	±	S.D.	C.V.	Кол-во репликаторов
				%	
a	0,35	±	0,005	13,4	10
b	2,22	±	0,12	5,5	10
c	48,83	±	1,55	3,2	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

HbeAg

Сыворотка	Среднее значение	±	S.D.	C.V.	Кол-во постановок
				%	
	S/CO				
a	1,2	±	0,08	7,5	10
b	37,02	±	4,62	12,5	10
c	68,04	±	4,68	6,87	10

Анти-HBe

Сыворотка	Среднее значение	±	S.D.	C.V.	Кол-во постановок
				%	
	S/CO				
a	0,22	±	0,02	7,87	10
b	0,80	±	0,10	12,2	10
c	1,75	±	0,18	10,6	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты разных серий набора (см. п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.1.) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте только дистиллированную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.

– Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.

– Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.

– Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.

– Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.

– Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

– При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.

– Не разрешается пипетировать ртом.

– Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

– Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

– Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

– Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирачный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

– Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке

– Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.

– Градуированные цилиндры для разведения реагентов.

– Дистиллированная вода.

– Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

– Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620,450 и 405 нм.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. При необходимости более длительного хранения образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

7.1. HBeAg

- Доведите реагенты до комнатной температуры (+18...25°C).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов: Отрицательный контроль наносится в тетрапликате, Положительный контроль - в дубликате, исследуемые образцы наносятся в монопликатах. Оставьте 2 лунки для обнуления (Blank).

7.1.2. Внесите по 100 мкл контролей и образцов в соответствующие лунки.

7.1.3. Внесите во все лунки по 100 мкл Конъюгата, исключая лунки Blank.

7.1.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора).

7.1.5. Инкубируйте его в течение 3 часов $\pm$ 10 минут при 37 $\pm$ 2 °C.

7.1.6. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза, внося при каждой промывке по 350 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.1.7. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.

7.1.8. Инкубируйте в течение 20 $\pm$ 2 минут при 37 $\pm$ 2°C. Избегайте прямого попадания солнечного света на планшет.

7.1.9. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

7.2. Анти-HBe

- Доведите реагенты до комнатной температуры (+18...25°C).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.2.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов: Отрицательный контроль (КП 0 мМЕ/мл) наносится в тетрапликате, Положительный контроль (КП 100 мМЕ/мл) наносится в дубликате, исследуемые образцы наносятся в монопликатах. Оставьте 2 лунки для обнуления (Blank).

7.2.2. Внесите по 50 мкл контролей и образцов в соответствующие лунки.

7.2.3. Внесите во все лунки по 50 мкл Нейтрализующего раствора, исключая лунки Blank.

7.2.4. Внесите во все лунки по 100 мкл Конъюгата, исключая лунки Blank.

7.2.5. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора).

7.2.6. Инкубируйте его в течение 3 часов $\pm$ 10 минут при 37 $\pm$ 2°C.

7.2.7. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза, внося при каждой промывке по 350 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.2.8. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.

7.2.9. Инкубируйте в течение 20 $\pm$ 2 минут при 37 $\pm$ 2°C. Избегайте прямого попадания солнечного света на планшет.

7.2.10. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМЫ АНАЛИЗОВ приведены на странице 7.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при двух длинах волн 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить область кривой.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 HBeAg

Определите среднее значение оптической плотности (ОП) Отрицательного Контроля (ОК) и Положительного контроля (ПК). Рассчитайте значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = \text{ОП}_{\text{срОК}} + 0,100$$

Присутствие или отсутствие HBeAg определяется путем сравнения ОП образца со значением Cut-off.

Образцы с ОП ниже Cut-off признают не реактивными (не содержащими HBeAg).

Образцы с ОП выше Cut-off признают реактивными (содержащими HBeAg) и требуют повторного тестирования для подтверждения положительного результата. Если при повторном тестировании получен отрицательный результат, образец признается не реактивным. Если же при повторном тестировании получен положительный результат, образец признается реактивным.

Область значений ОП $\pm 10\%$ от Cut-off является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требует повторного тестирования для подтверждения.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных.

ОП репликатов Отрицательного контроля:	0,015 – 0,018 – 0,020 – 0,019
Среднее значение:	0,018
Критерий достоверности ($< 0,050$)	Выполняется
Cut-Off = $0,018 + 0,100 = 0,118$	
ОП Положительного контроля:	1,480 – 1,500
Среднее значение:	1,490
Критерий достоверности ($> 0,800$)	Выполняется

9.2 Анти-НВе

Определите среднее значение оптической плотности (ОП) Отрицательного Контроля (ОК) и Положительного контроля (ПК). Рассчитайте значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = (\text{ОПсрОК} + \text{ОПсрПК})/2$$

Присутствие или отсутствие антител против НВеАг определяется путем сравнения ОП образца со значением Cut-off.

Образцы с ОП выше Cut-off признают не реактивными (не содержащими антитела против НВеАг).

Образцы с ОП ниже Cut-off признают реактивными (содержащими антитела против НВеАг) и требуют повторного тестирования для подтверждения положительного результата. Если при повторном тестировании получен отрицательный результат, образец признается не реактивным. Если же при повторном тестировании получен положительный результат, образец признается реактивным.

Область значений ОП $\pm 10\%$ от Cut-off является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требует повторного тестирования для подтверждения.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных.

ОП репликатов Отрицательного контроля:	1,750 – 1,790 – 1,720 – 1,760
Среднее значение:	1,755
Критерий достоверности ($> 1,000$)	Выполняется
ОП Положительного контроля:	0,020 – 0,030
Среднее значение:	0,025
ОПсрОК/ОПсрПК	70,2
Критерий достоверности (> 10)	Выполняется
Cut-Off = $(1,755 + 0,025)/2 = 0,890$	

9.3. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям.

Описание	Условие	
	НВеАг	Анти-НВе
ОП Отрицательного контроля при 450 нм	$< 0,050$	$> 1,00$
ОП Положительного контроля при 450 нм	$> 0,800$	-----
ОПсрОК/ОПсрПК	-----	$> 10,0$

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.4. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию НВеАг или антител против НВеАг.
- Реактивные образцы признают положительными по содержанию НВеАг или антител против НВеАг.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

HBeAg

Лунки	Blank	NEG	POS Ag	Образцы
Реагенты				
NEG	-----	100 мкл	-----	-----
POS Ag	-----	-----	100 мкл	-----
Образцы	-----	-----	-----	100 мкл
Конъюгат CONJ	-----	200 мкл	200 мкл	200 мкл

– Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 3 часа $\pm$ 10 мин.

– Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------

– Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 20 ± 2 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 nm.

Анти-HBe

Лунки	Blank	NEG	POS Ab	Образцы
Реагенты				
NEG	-----	50 мкл	-----	-----
POS Ab	-----	-----	50 мкл	-----
Образцы	-----	-----	-----	50 мкл
NEUT	-----	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Конъюгат CONJ	-----	100 мкл	100 мкл	100л

– Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 3 часа $\pm$ 10 мин.

– Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------

– Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 20 ± 2 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 nm.

еральный директор
О «Компания Алкор Био»

оводитель лаборатории разработки ИФА-систем
О «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
_____ М.В. Швырев

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ HBsAg

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Определение поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке или плазме крови человека играет важную роль в диагностике Гепатита В. HBsAg начинает определяться в крови через 4 – 12 недель после инфицирования и предшествует клиническим проявлениям заболевания. Присутствие в крови этого маркера говорит о наличии ВГВ инфекции. Эта тест-система – третье поколение наборов для качественного определения HBsAg в сыворотке или плазме человека. В ней использованы два моноклональных антитела, которые узнают «а» детерминанту, общую для субтипов «ad» и «ay».

Тест-система HBsAg предназначена для качественного определения поверхностного антигена вируса Гепатита В в сыворотке и плазме крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе реагентов реализован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого использованы антитела с различной эпитопной специфичностью к поверхностному антигену Гепатита В. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата антител с пероксидазой, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация антигена, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации антигеном. Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству антигена в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках наличие HBsAg оценивается относительно значения cut-off.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество		Состояние
	1й вариант комплектации	2й вариант комплектации	
Планшет MTP	1x 96 лунок	2x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	1 x 50 мл	Концентрат Конс.
Отрицательный контроль NEG	1 x 2,0 мл	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
Положительный контроль POS	1 x 1,0 мл	1 x 1,0 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Реагенты:

- **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок), лунки стрипов планшета покрыты мышинными моноклональными антителами к HBsAg. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).
- **Промывочный раствор (WASH) / Washing Solution (concentrated):** 1 флакон. Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: Тимеросал (< 0,05%). Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:10. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C.
- **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, отрицательный по отношению ко всем маркерам гепатита В и не содержащий антитела к вирусу гепатита С и ВИЧ. Консервант: неомицин и тимеросал (<0,05%). Готов к использованию.
- **Положительный контроль (POS) / Positive Control:** 1 флакон. Буферный раствор содержащий HBsAg. Консервант: неомицин и тимеросал (<0,05%). Готов к использованию.
- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон или 2 флакона. Раствор на основе трисового буфера содержит моноклональные антитела к HBsAg, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO). Консервант: неомицин. Готов к использованию.
- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность

Диагностическая специфичность была определена на 1500 образцах, полученных от доноров, и составила 99,8%.

3.2 Чувствительность

Чувствительность определялась путем анализа серии разведений стандартов на HBsAg (субтипы «ad» и «ay»), полученных из института Пауля Эрлиха. Концентрации выражены в Ед/мл.

Субтип ad			Субтип ay		
Концентрация	Оптическая плотность		Концентрация	Оптическая плотность	
	Процедура А	Процедура В		Процедура А	Процедура В
4 Ед/мл	1,810	0,932	4 Ед/мл	2,321	1,112
1 Ед/мл	0,469	0,225	1 Ед/мл	0,698	0,386
0,5 Ед/мл	0,225	0,110	0,5 Ед/мл	0,343	0,178
0,25 Ед/мл	0,116	0,065	0,25 Ед/мл	0,172	0,095
0,125 Ед/мл	0,061	0,035	0,125 Ед/мл	0,095	0,063
0,062 Ед/мл	0,030	0,022	0,062 Ед/мл	0,042	0,020

Среднее значение ОП Отрицательного контроля = 0,017

Значение Cut-off: Вариант А: 0,067

Вариант В: 0,047

Минимальная определяемая концентрация для субтипа ad – 0,15 Ед/мл, а для субтипа ay – 0,08 Ед/мл.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты (см. 2.2.1.) разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте дистиллированную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.

- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
 - Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
 - В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
 - Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
 - Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
 - Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
 - Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
 - Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.
- Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:**
- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
 - Не разрешается пипетировать ртом.
 - Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
 - Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
 - Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
 - Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирачный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
 - Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы должны быть отбракованы. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение 1-2 суток. При необходимости более длительного хранения образцы следует заморозить при -20°C . Образцы плазмы крови могут содержать фибриновые включения, которые могут оказывать влияние на результаты анализа, поэтому перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

– Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 2 лунки для обнуления (Blank), 4 лунки для отрицательного контроля и 2 лунки для положительного контроля.

7.2. Внесите по 100 мкл контролей и образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Внесите во все лунки, исключая лунки Blank, по 100 мкл Конъюгата.

7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора).

7.5. Инкубируйте его в течение: **Процедура А – 3 часа при $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.**

Процедура В – 90 минут при $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.

7.6. Удалите содержимое лунок и промойте их 4 раза, внося при каждой промывке по 300 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.7. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.

7.8. Инкубируйте в течение 20 минут при $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ в темноте.

7.9. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 5.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание:

1) При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Анализ результатов

9.1.1. Определить оптическую плотность (ОП) Отрицательного контроля. Найдите среднее значение оптической плотности для Отрицательного контроля, исключая значения выше 0,1 ед.опт.пл. Если два или больше значений ОП Отрицательного контроля больше 0,1 ед.опт.пл., анализ необходимо повторить.

9.1.2. Определить ОП Положительного контроля. Найдите среднее значение ОП для Положительного контроля, которое должно быть выше 0,8 ед.опт.пл. (Процедура А) или выше 0,4 ед.опт.пл. (Процедура В).

9.1.3. Рассчитать значение Cut-off:

Процедура А – $\text{ОП}_{\text{ср.ОК}} + 0,050$

Процедура В – $\text{ОП}_{\text{ср.ОК}} + 0,030$

Присутствие или отсутствие HBsAg определяется путем сравнения ОП образца со значением Cut-off.

Образцы с ОП ниже Cut-off – признают нереактивными (не содержащими HBsAg).

Образцы с ОП выше Cut-off - признают реактивными (содержащими HBsAg). Такие образцы должны быть проанализированы повторно. Если при повторном анализе полученная ОП ниже значения Cut-off, образец признают нереактивным. Если же полученная ОП выше значения Cut-off, образец признают реактивным.

Область значений ОП $\pm 10\%$ от Cut-off является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным. Такие образцы должны быть проанализированы повторно.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных.

Отрицательный контроль:

$$(0,008 + 0,010 + 0,009 + 0,013)/4 = 0,01 \text{ (ОП ср. ОК)}$$

Положительный контроль:

$$\text{Процедура А: } (1,216 + 1,280)/2 = 1,248 \text{ (ОП ср. ПК)}$$

$$\text{Процедура В: } (0,826 + 0,817)/2 = 0,848 \text{ (ОП ср. ПК)}$$

Оптические плотности контролей соответствуют критериям.

Значение Cut-off:

$$\text{Процедура А: } (0,010 + 0,050) = 0,060$$

$$\text{Процедура В: } (0,010 + 0,030) = 0,040$$

9.2. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию HBsAg.
- Реактивные образцы признают положительными по содержанию HBsAg.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.

СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разведение образцов: 1:101

Реагенты \ Лунки	Blank	NEG	POS	Образцы
NEG	-----	100 мкл	-----	-----
POS	-----	-----	100 мкл	-----
Образцы	-----	-----	-----	100 мкл
Конъюгат CONJ	-----	100 мкл	100 мкл	100 мкл

- Процедура А: Инкубация: $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, 3 часа.
- Процедура В: Инкубация: $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, 90 мин.
- Промывка: 4 x 300 мкл.

Раствор ТМБ ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, 20 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм).

альный директор
«Компания Алкор Био»

водитель лаборатории разработки ИФА-систем
«Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

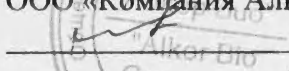
Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 6 (шесть) лист ев

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
 М.В. Швырев



«УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Швырев М.В.
« 12 » _____ 2011г



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И/ЛИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К
ПОВЕРХНОСТНОМУ АНТИГЕНУ ВИРУСА ГЕПАТИТА В
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
HBsAb**

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Определение антител против поверхностного антигена вируса гепатита В (анти-HBs), последнего маркера, появляющегося при сероконверсии, играет важную роль при наблюдении за пациентами во время реконвалесценции (или при прогнозе течения ВГВ инфекции), а также позволяет оценить эффективность вакцинации. Обычно анти-HBs антитела появляются в конце «сероконверсионного окна», вслед за падением концентрации HBsAg, и могут сохраняться в крови годами или даже в течение всей жизни человека. Отсутствие сероконверсии, обусловленной анти-HBs антителами, говорит о том, что инфекция переходит в хроническую форму (5% случаев ВГВ инфекции).

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе реагентов, предназначенном для качественного и/или количественного определения антител к HBsAg (HBsAb), реализован «сэндвич» - вариант твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Для реализации этого варианта использованы два HBsAg, один из которых иммобилизован на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второй конъюгирован с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата HBsAg-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация антител к HBsAg, содержащихся в исследуемом образце, и связывание образовавшегося комплекса с конъюгатом. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации антител к HBsAg в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация иммуноглобулинов к HBsAg в исследуемых образцах. В случае проведения качественного анализа наличие специфических антител оценивают относительно значения cut-off.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

РЕАГЕНТЫ - KIT REAGENTS

Реагент	Количество		Состояние
	1й вариант комплектации	2й вариант комплектации	
Планшет MTP	1x 96 лунок	2 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	1 x 100 мл	Концентрат Conc.
Раствор для разведения DIL	1 x 20 мл	2 x 20 мл	Готов к использованию Ready for use
Калибраторы CAL	6 x 1,0 мл	6 x 1,0 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	2 x 17,5 мл	3 x 17,5 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplate:** 1 или 2 планшета из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок). Лунки стрипов планшета покрыты HBsAg (субтипы «ad» и «ay»). Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).
- **Калибраторы (CAL) / Calibrators:** 6 флаконов. Растворы на основе сыворотки крови, содержащие антитела класса IgG к HBsAg в следующих концентрациях: 0, 10, 30, 100, 300 и 1000 мМЕ/мл и не содержащие HBsAg, антитела к вирусу гепатита С и ВИЧ. Калибраторы аттестованы относительно Первого Международного стандарта. Готовы к использованию. Консерванты: неомицин и тимеросал (<0,05%). При постановке качественного анализа нулевой калибратор и калибратор с концентрацией 1000 мМЕ/мл должны быть использованы в качестве отрицательной и положительной контрольных проб соответственно.
- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 2 флакона или 3 флакона. Раствор на основе трисового буфера, содержит HBsAg (субтипы «ad» и «ay»), конъюгированный с пероксидазой хрена (HRPO) и БСА. Готов к использованию. Консервант: неомицин.
- **Раствор для разведения (DIL) / Sample Diluent:** 1 флакон или 2 флакона. Раствор на основе сыворотки крови, отрицательный по отношению ко всем маркерам гепатита В и не содержащий HBsAg, антитела к вирусу гепатита С и ВИЧ. Готов к использованию. Консерванты: неомицин и тимеросал (<0,05%).
- **Промывочный раствор (WASH) / Washing Solution (concentrated):** 1 флакон. Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: Тимеросал (< 0.05%). Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:10. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 дней при +2...8°C. **Реагент общий для продуктов линий «HEPATITIS В» производства компании RADIM.**
- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон или 2 флакона. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон или 2 флакона. 1Н HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе более 500 образцов, полученных от доноров крови. Специфичность составляет $\geq 98\%$.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе более 200 положительных образцов. Чувствительность составляет $\geq 98\%$.

3.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матрике образца. Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина) или родственных вирусов. Дополнительные исследования, проведенные на сыворотках беременных женщин, показали, что качество анализа не изменяется под действием интерферирующих агентов.

3.4 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выражается минимальным количеством определяемого аналита, выявляемым с помощью данного метода. Минимальная достоверно определяемая концентрация составляет 4 мМЕ/мл. Эта величина была определена как концентрация аналита, отличающаяся от нулевого калибратора на три стандартных отклонения.

3.5 Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител против HBsAg.

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	$\pm$	S.D.	C.V. %	Кол-во репликатов
	(мМЕ/мл)				
a	37,66	$\pm$	2,42	6,4	10
b	40,16	$\pm$	2,81	7,0	10

c	499,0	±	59,2	11,8	10
---	-------	---	------	------	----

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее	±	S.D.	C.V. %	Кол-во постановок
	(мМЕ/мл)				
a	31,7	±	3,78	11,90	10
b	64,56	±	7,3	11,30	10
c	144,45	±	13,1	9,07	10

3.6 Хук-эффект

Если образцы с высокой концентрацией антител анализируются без предварительного разведения в одностадийных тест-системах формата «сэндвич», «хук-эффект» может способствовать занижению определяемой концентрации. В тест-системе HBsAb «хук-эффект» не обнаружен вплоть до концентрации 160000 мМЕ/мл.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты разных серий набора (см. п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
 - Смешивание общего реагента разных серий (см. п.2.2.1.) допускается.
 - Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
 - Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
 - Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
 - Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
 - Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
 - Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
 - Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
 - В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
 - Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
 - Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
 - Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
 - Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
 - Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.
- Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:**

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

– Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

– Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

– Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

– Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. При необходимости более длительного хранения образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением **количественного анализа** образцы с ожидаемой высокой концентрацией антител должны быть разведены с помощью Раствора для разведения. Рекомендуемое разведение 1:10. Например: 50 мкл образца + 450 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

7.1. Количественный анализ

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.
- 7.1.1. Промаркируйте лунки для калибраторов (вносятся в дубликатах) и исследуемых образцов (вносятся в монопликатах). Оставьте 2 лунки для обнуления (Blank).
- 7.1.2. Внесите **по 50 мкл** калибраторов и образцов в соответствующие лунки.
- 7.1.3. Внесите во все лунки **по 200 мкл** Конъюгата, исключая лунки Blank.
- 7.1.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора).
- 7.1.5. Инкубируйте его в течение **3 часов $\pm$ 10 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$** .
- 7.1.6. Удалите содержимое лунок и промойте лунки **6 раз**, внося при каждой промывке **по 350 мкл** разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.
- 7.1.7. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Раствора ТМБ.
- 7.1.8. Инкубируйте в течение **20 ± 2 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$** . Избегайте попадания света на планшет.
- 7.1.9. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Стоп-реагента.

7.2. Качественный анализ

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.2.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов: Отрицательный контроль (КП 0 мМЕ/мл) вносится в тетрапликате, Положительный контроль (КП 100 мМЕ/мл) вносится в дубликаты, исследуемые образцы вносятся в монопликаты. Оставьте 2 лунки для обнуления (Blank).

7.2.2. Внесите **по 50 мкл** контролей и образцов в соответствующие лунки.

7.2.3. Внесите во все лунки по **200 мкл** Конъюгата, исключая лунки Blank.

7.2.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора).

7.2.5. Инкубируйте его в течение **3 часов $\pm$ 10 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$.**

7.2.6. Удалите содержимое лунок и промойте лунки **6 раз**, внося при каждой промывке по **350 мкл** разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.2.7. Внесите во все лунки по **100 мкл** Раствора ТМБ.

7.2.8. Инкубируйте в течение **20 ± 2 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$** . Избегайте попадания света на планшет.

7.2.9. Внесите во все лунки по **100 мкл** Стоп-реактанта.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при двух длинах волн 405 и 450 нм (для образцов с концентрацией антител против HBsAg от 0 до 300 мМЕ/мл использовать длину волны 450 нм, а для образцов с концентрацией антител против HBsAg выше 300 мМЕ/мл использовать длину волны 405 нм). Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить область кривой.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Качественный анализ

Определите среднее значение оптической плотности (ОП) Отрицательного Контроля (ОК) и Положительного контроля (ПК). Рассчитайте значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = \text{ОП}_{\text{срОК}} + 0,060 \quad (1)$$

Присутствие или отсутствие антител против HBsAg определяется путем сравнения ОП образца со значением Cut-off.

Образцы с ОП ниже Cut-off признают нереактивными (не содержащими антитела против HBsAg).

Образцы с ОП выше или равной Cut-off признают реактивными (содержащими антитела против HBsAg).

Область значений ОП $\pm 10\%$ от Cut-off является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требует повторного тестирования для подтверждения. Если при повторном тестировании получен отрицательный результат, образец признается не реактивным. Если же при повторном тестировании получен положительный результат, образец признается реактивным.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных данных.

ОП репликатов Отрицательного контроля (ед.опт.плотн.): 0,020 ; 0,030 ; 0,020 ; 0,030

Среднее значение ОП ОК (ед.опт.плотн.): 0,025

$$\text{Cut-Off} = 0,025 + 0,060 = 0,085$$

ОП Положительного контроля (ед.опт.плотн.): 1,148 - 1,182

Среднее значение ОП ПК (ед.опт.плотн.): 1,165

ОП Образца 1: 0,031 ед.опт.плотн. - Образец считается отрицательным

ОП Образца 2: 2,080 ед.опт.плотн. - Образец считается положительным

9.2 Количественный анализ

Калибровочная кривая строится в линейных координатах, где по оси X откладывают концентрации каждого калибратора, а по оси Y – ОП каждого калибратора. Соответствующие концентрации исследуемых образцов (мМЕ/мл) получаются путем интерполяции ОП образца на калибровочной кривой. Для разведенных образцов полученная концентрация умножается на фактор разведения.

Образцы с концентрацией антител против HBsAg менее 4 мМЕ/мл признают не реактивными.

Образцы с концентрацией антител против HBsAg более или равной 4 мМЕ/мл признают реактивными.

Концентрация антител против HBsAg в образце равная 10 мМЕ/мл или более означает либо выздоровление пациента после острой ВГВ инфекции, либо говорит о наличии поствакцинального иммунитета.

Концентрация антител против HBsAg в образце от 4 до 10 мМЕ/мл является недостаточной для защиты от ВГВ.

Определение концентрации образцов

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных данных.

Например:

Описание	ОП 450 nm	Концентрация антител против HBsAg	ОП 405 nm	Концентрация антител против HBsAg
Калибратор 0 мМЕ/мл	0,025		0,009	
Калибратор 10 мМЕ/мл	0,142		0,049	
Калибратор 30 мМЕ/мл	0,358		0,125	
Калибратор 100 мМЕ/мл	1,160		0,410	
Калибратор 300 мМЕ/мл	2,550		0,895	
Калибратор 1000 мМЕ/мл	>3,000		1,875	
Образец 1	0,451	38 мМЕ/мл	0,160	
Образец 2	>3,000		1,440	680 мМЕ/мл

9.3. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

Описание	Условие
ОП Отрицательного контроля при 450 нм	< 0,070
ОП Кал 10 мМЕ/мл / ОП Кал 0 мМЕ/мл	> 2,0
ОП Положительного контроля при 450 нм	> 0,600

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.4. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию антител против HBsAg.
- Реактивные образцы признают положительными по содержанию антител против HBsAg.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Реагенты	Лунки	Blank	Калибраторы	Образцы
Калибраторы CAL		-----	50 мкл	-----
Образцы		-----	-----	50 мкл
Конъюгат CONJ		-----	200 мкл	200 мкл

- Инкубация: 37±2°C, 3 часа ± 10 мин.
- Промывка: 6 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 20±2 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 nm.

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 7. (силь) лист об

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



«УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 12 »

2011г



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОДНОСТАДИЙНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА
ГЕПАТИТА В В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
HBsAg one**

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) описывает Гепатит В следующим образом:

«Гепатит В – это одна из главных болезней человечества и серьезная медицинская проблема мирового масштаба. Гепатит – это воспаление печени причиной которого в большинстве случаев являются 5 вирусов, называемые вирусами гепатитов А, В, С, D и Е. Все эти вирусы вызывают острое заболевание с симптомами, длящимися несколько недель и включающие пожелтение кожи и глаз (желтуха), потемнение мочи, слабость, тошноту, рвоту и боли в животе. Период реконвалесценции может длиться от нескольких месяцев до года. Гепатит В может перейти в хроническую форму при которой у пациента сохраняется вирусемия и которая может через несколько лет закончиться циррозом или раком печени.

Вирус Гепатита В (ВГВ) наиболее опасный среди вирусов гепатита и единственный вирус, вызывающий хронический гепатит, для профилактики которого разработана вакцина. ВГВ передается при контакте с зараженной кровью или другими биологическими жидкостями, подобно вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ), который вызывает СПИД. Однако вирус Гепатита В в 50 – 100 раз более контагиозный, чем ВИЧ. Главные пути заражения ВГВ – это перинатальный (от матери к ребенку при рождении), контактно-бытовой, парентеральный и половой.

В мире большинство случаев инфицирования ВГВ связано с заражением ребенка от инфицированной матери, с передачей вируса при бытовом контакте и с повторным использованием нестерилизованных шприцев и игл. В развивающихся странах почти все дети инфицированы ВГВ. В развитых странах преобладают другие пути передачи инфекции. В этих странах, до введения программы вакцинирования детей, треть случаев хронического Гепатита В приходилась на перинатальный и контактно-бытовой пути передачи. Однако сейчас, большинство случаев заражения подростков связано с незащищенными половыми контактами и употреблением наркотиков. Кроме того, вирус Гепатита В представляет опасность для медицинских работников и большинство медицинских работников вакцинированы против ВГВ.

Вирус Гепатита В не передается через зараженную пищу и воду и им не возможно заразиться воздушно-капельным путем.

Высокий уровень хронического гепатита В характерен для южных районов Восточной и Центральной Европы. На Среднем Востоке и в Индии около 5% населения имеют хроническую ВГВ инфекцию, в то время как в странах Западной Европы и Северной Америки меньше 1% населения.

Инфекция ВГВ у детей в большинстве случаев переходит в хроническую форму. У 90% детей, инфицированных в первый год жизни, и у 30 – 50% детей, инфицированных в возрасте от 1 года до 4 лет, развивается хроническая ВГВ инфекция. Риск смертельного исхода от рака или цирроза печени при хронической ВГВ инфекции составляет приблизительно 25%. Хронический Гепатит В лечат интерфероном и ламивудином, в ряде случаев эти препараты дают положительный эффект. Иногда для лечения больных с циррозом используют трансплантацию печени. И все же это заболевание легче предупредить, чем лечить.

Вакцина против Гепатита В безопасна и очень эффективна. С 1982 года, во всем мире было использовано более 1 миллиарда доз. Вакцина вводится 3 раза, внутримышечно. Как показали исследования, вакцинация в 95% случаев предотвращает развитие хронического Гепатита В у детей и взрослых. В странах, где до введения вакцинопрофилактики от 8 до 15% детей имели хроническую ВГВ инфекцию, после начала вакцинации этот показатель снизился ниже 1%. С 1991 года, ВОЗ призвал все страны включить вакцину против Гепатита В в национальные программы вакцинопрофилактики.»

Поверхностный антиген вируса Гепатита В (HBsAg) - наиболее важный белок оболочки вируса. HBsAg содержит детерминанту «а» общую для всех известных субтипов вируса Гепатита В, которые объединены в 2 группы «ad» и «ay». Тест-системы последнего поколения имеют очень высокую чувствительность определения HBsAg, что помогает в изучении распределения и эпидемиологии ВГВ, а также снижает риск передачи инфекции при переливании крови и ее продуктов.

Тест-система HbsAg one предназначена для качественного определения поверхностного антигена вируса Гепатита В в сыворотке и плазме крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе реагентов реализован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого использованы антитела с различной эпитопной специфичностью к поверхностному антигену Гепатита В. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата антител с пероксидазой, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация антигена, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации антигеном. Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации антигена в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках наличие HBsAg оценивается относительно значения cut-off.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество		Состояние
	1-й вариант комплектации	2-й вариант комплектации	
MICROPLATE Микропланшет	1 x 96 лунок	2 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
CONTROL - Отрицательный контроль	1 x 4,0 мл	2 x 4,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CONTROL + Положительный контроль	1 x 2,0 мл	1 x 4,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CAL Калибровочная проба	2 флакона	4 флакона	Лиофилизированный препарат
WASHBUF 20X 20x Промывочный буфер	2 x 50 мл	2 x 50 мл	Концентрированный раствор Conc.
CONJ DIL Раствор для Разведения Конъюгат	1 x 15 мл	1 x 30 мл	Готов к использованию Ready for use
CONJ 20X Конъюгат	1 x 0,8 мл	1 x 1,5 мл	Концентрированный раствор Conc
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 или на 192 лунки.

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplate:** 1 или 2 планшета из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок). Лунки стрипов планшета покрыты мышинными моноклональными антителами к «а» детерминанте HBsAg. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...+8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

- **Отрицательный контроль (CONTROL -) / Negative Control:** 1 флакон или 2 флакона. Раствор желтого цвета на основе 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4±0,1, содержит сыворотку козы. Готов к использованию. Консервант: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.

- **Положительный контроль (CONTROL +) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор зеленого цвета на основе 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4±0,1, содержит сыворотку козы и рекомбинантный HBsAg. Готов к использованию. Консерванты: 0,02% гентамицина сульфат и 0,1% Катон GC.

- **Калибратор (CAL) / Calibrator:** 2 флакона или 4 флакона. Содержит фетальную бычью сыворотку и рекомбинантный HBsAg в концентрации 0,5 МЕ/мл (аттестован по Второму Международному Стандарту для HBsAg, NIBSC, 00/588). Консервант: 0,02% гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Лиофилизирован. Перед использованием растворите содержимое флакона в объеме дистиллированной воды, указанном на этикетке. Восстановленный реагент хранить при -20°C. Повторное замораживание не допускается.

Внимание: Объем дистиллированной воды, необходимый для растворения содержимого флакона, может быть различным для разных вариантов комплектаций реагента. Обратите внимание, чтобы препарат был растворен именно в том объеме воды, который указан на этикетке флакона.

- **Промывочный раствор 20x (WASHBUF 20X) / Washing buffer concentrate:** 2 флакона. 1x Промывочный буфер представляет собой 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7,0±0,2, содержащий

0,05% Твин 20 и 0,1% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 7 суток при +2...8°C.

- **Дилуент для конъюгата (CONJ DIL) / Enzyme Conjugate Diluent:** 1 флакон. Раствор красного цвета на основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,8±0,1, содержит 1% мышиную сыворотку, 5% БСА, 0,02% гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC.
- **Конъюгат 20х (CONJ 20X) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон. Раствор на основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,8±0,1, содержит мышиные моноклональные антитела к детерминанте «а» HBsAg, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), 5% БСА, 0,02% гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата конъюгата дилуентом для конъюгата в соотношении 1:20.
- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон или 2 флакона. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон или 2 флакона. 1Н HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определялась на панели образцов, полученных от доноров и пациентов, не имеющих иммунитета к ВГА, которые были определены как отрицательные тест-системой, зарегистрированной в Министерстве Здравоохранения Италии.

Не было обнаружено ложноположительных реакций при тестировании анализируемых образцов разных типов.

Не было также обнаружено влияния на специфичность заморозки анализируемых образцов.

Образцы, содержащие все известные субтипы ad и ay, а также изоформы w и г, полученные из CNTS(Франция), открылись как положительные.

Были протестированы образцы пациентов с другими вирусными заболеваниями (ВГС, ВГА) и с гепатитами невирусной природы. Ложноположительных реакций обнаружено не было.

В общей сложности в независимых референсных лабораториях было протестировано более 5000 образцов. Диагностическая специфичность составила > 99,5%.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определялась на панели образцов, которые были определены как положительные тест-системой, одобренной FDA. Образцы были собраны из разных географических регионов (включали оба субтипа ad и ay) и с разными формами ВГВ инфекции (острой, бессимптомной и хронической). В общей сложности было протестировано более 400 образцов. Диагностическая чувствительность составила 100%.

Дополнительно были протестированы более 20 сероконверсионных панелей и панель для определения качества тест-системы (ВВІ, США). Результаты, полученные при тестировании двух сероконверсионных панелей, представлены в нижеследующих таблицах:

Панель PHM 918

Образец	Концентрация HBsAg, нг/мл	RADIM, S/CO	Ortho EIA, S/CO	Sorin EIA, S/CO
01	< 0,1	0,4	0,2	0,0
02	< 0,1	0,3	0,2	0,1
03	< 0,1	0,3	0,2	0,0
04	< 0,1	0,4	0,1	0,0
05	< 0,1	0,4	0,2	0,0
06	< 0,1	0,4	0,6	0,1
07	< 0,1	0,4	0,2	0,1
08	< 0,1	0,5	0,2	0,1
09	0,2	0,9	0,4	0,2
10	0,5	1,4	2,2	1,2
11	2,3	4,5	10,1	6,2

Панель PHM 923

Образец	Концентрация HBsAg, нг/мл	RADIM, S/CO	Ortho EIA, S/CO	Sorin EIA, S/CO
01	< 0,1	0,4	0,1	0,0
02	< 0,1	0,4	0,2	0,1
03	< 0,2	1,2	1,4	0,9
04	< 0,5	1,4	2,6	1,8

3.3 Прецизионность

Исследования проводили на трех образцах, которые наносили в нескольких репликатах и анализировали в разных постановках. Данные, полученные для двух образцов (один отрицательный и один слабоположительный), которые наносили в 16 репликатах и анализировали в трех независимых постановках, на трех лотах набора, представлены в нижеследующих таблицах.

Лот 1

Отрицательный образец

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,036	0,036	0,032	0,034
Ст. откл.	0,004	0,006	0,005	0,005
КВ, %	10,1	15,5	16,2	13,9

NIBSC 0,1 нг/мл

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,133	0,121	0,118	0,124
Ст. откл.	0,019	0,008	0,011	0,013
КВ, %	14,1	6,9	9,2	10,1
S/CO	1,5	1,4	1,4	1,4

Лот 2

Отрицательный образец

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,034	0,035	0,031	0,033
Ст. откл.	0,005	0,005	0,005	0,005
КВ, %	15,5	13,5	15,4	14,8

NIBSC 0,1 нг/мл

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,125	0,129	0,129	0,127
Ст. откл.	0,012	0,010	0,013	0,012
КВ, %	9,7	7,5	10,4	9,2
S/CO	1,5	1,5	1,6	1,5

Лот 3

Отрицательный образец

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,034	0,035	0,034	0,034
Ст. откл.	0,004	0,005	0,004	0,004
КВ, %	10,5	12,9	11,2	11,5

NIBSC 0,1 нг/мл

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,124	0,129	0,126	0,126
Ст. откл.	0,009	0,012	0,015	0,012
КВ, %	7,2	9,4	11,7	9,4
S/CO	1,5	1,5	1,5	1,5

Изменения диагнозов образцов обнаружено не было.

3.4 Предел детекции

Этот параметр был определен с помощью следующих международных стандартов:

1. Стандарты, полученные из института Пауля Эрлиха (ИПЭ) (с концентрацией 50 и 100 Ед/мл);
2. Второй Британский Рабочий Стандарт (NIBSC, 99/640-005-WI);
3. Международный Стандарт (ВОЗ, 80/549);
4. Второй Международный Стандарт (NIBSC, 00/588).

Результаты контроля качества представлены в нижеследующей таблице:

Наименование стандарта	Концентрация, МЕ/мл или нг/мл
ИПЭ	
Ad субтип	0,0125
Ay субтип	0,0125
NIBSC, 99/640-005-WI	0,03
Первый Международный Стандарт	0,05

Панель №806 (BBI, США) также использовалась для определения предела детекции. Результаты представлены в нижеследующей таблице:

№	Субтип HBsAg	BBI, нг/мл	Эббот, нг/мл	ИПЭ, Ед/мл	Лот 1, S/CO	Лот 2, S/CO	Лот 3, S/CO
806-1	ad	2,5	3,1	0,31	9,5	9,4	9,7
806-2	ad	1,5	1,6	0,17	5,1	5,0	5,3
806-3	ad	1	1	0,1	3,2	3,2	3,3
806-4	ad	0,8	0,9	0,09	2,6	2,4	2,8
806-5	ad	0,6	0,7	0,07	2,3	2,1	2,4
806-6	ad	0,5	0,5	0,06	2,0	1,8	1,9
806-7	ad	0,4	0,5	0,05	1,7	1,6	1,8
806-8	ad	0,3	0,3	0,03	1,4	1,3	1,5
806-9	ad	0,2	0,2	0,02	1,2	1,1	1,2
806-10	ad	0,1	0,1	0,01	0,8	0,7	0,8
806-11	ay	2,4	1,8	0,21	10,5	10,7	10,6
806-12	ay	1,3	1	0,11	5,3	5,6	5,5
806-13	ay	0,9	0,6	0,07	4,7	4,9	4,9
806-14	ay	0,8	0,5	0,06	3,9	4,0	4,0
806-15	ay	0,6	0,4	0,05	2,6	2,7	2,5
806-16	ay	0,5	0,4	0,04	2,4	2,5	2,5
806-17	ay	0,4	0,3	0,03	1,7	1,8	1,9
806-18	ay	0,3	0,3	0,03	1,6	1,7	1,7
806-19	ay	0,2	0,2	0,02	1,4	1,6	1,5
806-20	ay	0,1	0,1	0,01	1,1	1,2	1,1
806-21	отрицательная	0	0	0	0,2	0,2	0,2

Также была исследована панель для определения чувствительности, полученная из EFS (Франция). Результаты представлены ниже:

Образец	Концентрация HBsAg, нг/мл	ОП 450 нм	S/CO	ORTHO S/CO
HB 1	0,10	0,039	0,7	0,6
HB 2	0,20	0,082	1,4	1,2
HB 3	0,30	0,116	2,0	1,8
HB 4	0,45	0,161	2,7	2,8
HB 5	0,66	0,210	3,6	3,9
HB 6	дильuent	0,009	0,2	0,2

Результаты исследования панели SFTS (Франция) Ag HBs 2004 представлены в нижеследующей таблице:

Образец	Субтип	Концентрация, нг/мл	S/CO
151	Adw2 + ayw3	2,24 ± 0,15	10,8
152	Adw2 + ayw3	1,15 ± 0,06	5,8
153	Adw2 + ayw3	0,95 ± 0,05	5,0
154	Adw2 + ayw3	0,58 ± 0,04	3,3
155	Adw2 + ayw3	0,50 ± 0,03	2,6
156	Adw2 + ayw3	0,36 ± 0,02	1,9
157	Adw2 + ayw3	0,23 ± 0,02	1,3
158	Adw2 + ayw3	0,13 ± 0,02	0,7
159	Adw2 + ayw3	0,06 ± 0,01	0,4
160	Adw2 + ayw3	0,04 ± 0,01	0,2
161	Adw2	0,5 ± 1,0	2,8
162	Adw4	0,5 ± 1,0	2,6
163	Adr	0,5 ± 1,0	3,0
164	Ayw1	0,5 ± 1,0	2,9
165	Ayw2	0,5 ± 1,0	3,9
166	Ayw3	0,5 ± 1,0	4,6
167	Ayw3	0,5 ± 1,0	4,3
168	Ayw4	0,5 ± 1,0	4,2
169	Ayr	0,5 ± 1,0	3,6

170	дилуэнт	/	0,1
-----	---------	---	-----

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте реагенты разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
 - Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
 - Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
 - Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
 - Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
 - Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
 - Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
 - Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
 - Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
 - В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
 - Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
 - Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
 - Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
 - Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
 - Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.
- Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:**
- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
 - Не разрешается пипетировать ртом.
 - Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
 - Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
 - Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
 - Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
 - Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

– При заборе венозной крови следует соблюдать правила асептики. Сыворотку или плазму крови получают по общепринятой методике подготовки образцов для лабораторного анализа. Не было обнаружено существенного влияния цитрата, солей ЭДТА и гепарина на результаты анализа.

– Не допускается добавление в анализируемые образцы консервантов, особенно азиды натрия, так как они могут повлиять на ферментативную активность конъюгата и способствовать возникновению ложноотрицательных результатов.

– Образцы должны быть четко маркированы во избежание ошибочной интерпретации результатов. Настоятельно рекомендуется применять штрих-кодирование и электронный датчик для считывания штрих-кода, в особенности если набор применяется для скрининга донорской крови.

– Не допускается применять образцы с видимыми признаками гемолиза (красный цвет) и липемии («молочный» оттенок), так как при этом может быть получен ложный результат. По этой же причине не допускается применять образцы, содержащие фибрин, твердые частицы или видимые признаки микробной контаминации.

– Сыворотку и плазму допускается хранить при температуре $+2^\circ\text{C}$ до $+8^\circ\text{C}$ в течение 5 суток после сбора. При необходимости более длительного хранения образцы допускается хранить при температуре -20°C в течение нескольких месяцев. Не допускается повторное замораживание/размораживание образцов, так как образовавшиеся при этом включения могут влиять на результат анализа.

– При обнаружении твердых частиц, образцы перед проведением анализа центрифугируют в течение 20 минут при 2000 об/мин, либо очищают фильтрованием (диаметр пор фильтра 0.2-0.8 мкм).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18\ldots+25^\circ\text{C}$).

– Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Перед проведением анализа промойте необходимое количество лунок один раз.

Примечание: Промывка стрипов перед анализом необходима для получения достоверных результатов. Ни в коем случае не пропускайте этот этап.

7.2. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank), 3 лунки для отрицательного контроля, 2 лунки для калибратора и одну лунку для положительного контроля.

7.3. Внесите по 150 мкл контролей в соответствующие лунки.

7.4. Внесите по 150 мкл анализируемых образцов.

Примечание: Убедитесь, что контроли и образцы были действительно добавлены в лунки.

7.5. Внесите во все лунки, кроме лунки A1, по 100 мкл разведенного Конъюгата. Убедитесь, что цвет раствора в лунках с образцами изменился с желтоватого на красный. Заклейте планшет клейкой пленкой.

Примечание: Во время внесения Конъюгата избегайте прикасаться наконечником пипетки к внутренней стороне лунок во избежание контаминации.

7.6. Инкубируйте планшет в течение 120 минут при 37°C .

Примечание: Стрипы следует заклеивать специальной пленкой, входящей в состав набора, только в том случае, если анализ проводится вручную. При автоматической постановке анализа клейкая пленка не требуется.

7.7. Удалите содержимое лунок и с помощью автоматического промывочного устройства промойте микропланшет **4–5 раз** подготовленным к работе Промывочным раствором. При каждой промывке добавляйте **по 350 мкл** Промывочного раствора в каждую лунку.

7.8. Внесите **по 100 мкл** Раствора ТМБ в каждую лунку, включая А1. Инкубируйте планшет **при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 30 минут**. Избегайте попадания света на планшет во избежание высокого фонового сигнала.

7.9. Остановите ферментативную реакцию добавлением **100 мкл** Стоп-реагента в каждую лунку. Стоп-реагент следует вносить в лунки в той же последовательности, как и Раствор ТМБ. После внесения Стоп-реагента окраска Положительного контроля и положительных образцов изменится с голубой на желтую.

Примечание: Если для анализа используются образцы, содержащие включения или хранившиеся при минусовых температурах, образцы с видимым гемолизом или липемией необходимо проводить анализ по следующей схеме:

1. Внесите по 100 мкл контролей, калибратора и образцов.
2. Инкубируйте 60 мин при +37°C с шейкированием 350±150 rpm.
3. Удалите содержимое лунок и промойте согласно п.7.7.
4. Внесите во все лунки, кроме лунки А1, по 100 мкл разведенного конъюгата.
5. Инкубируйте 30 мин при +37°C с шейкированием 350±150 rpm.
6. Удалите содержимое лунок и промойте согласно п.7.7.
7. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.
8. Инкубируйте 30 мин при комнатной температуре с шейкированием 350±150 rpm.
9. Добавьте во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

*При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 10.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определите среднюю оптическую плотность (ОП) Отрицательного контроля (ОК). Рассчитайте значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = \text{ОПсрОК} + 0,050 \quad (1)$$

Примечание: Если расчет результатов проводится операционной системой автоматического анализатора, следует убедиться, что задана правильная формула для вычисления значения cut-off и последующего расчета результатов.

Присутствие или отсутствие HBsAg определяется путем деления значения ОП образца на Cut-off.

Образцы, для которых при делении на Cut-off получено значение:

- менее 0,9, признают нереактивными (не содержащими HBsAg);
- более 1,1, признают реактивными (содержащими HBsAg);
- 0,9 – 1,1, признают сомнительными.

Отрицательный результат означает, что пациент не был инфицирован вирусом гепатита В и что кровь может использоваться для переливания.

У всех пациентов с сомнительным результатом следует повторить анализ через 1-2 недели, получив для этого свежий образец сыворотки или плазмы. Препарат донорской крови, давший сомнительный результат, не допускается использовать для переливания.

Положительный результат анализа указывает на наличие ВГВ. Пациент должен получить соответствующую медицинскую помощь.

Примечания:

- Во избежание ошибок, интерпретацию результатов следует проводить под наблюдением руководителя лаборатории.
- Любой положительный результат должен быть подтвержден повторным тестированием образца после фильтрации (диаметр пор фильтра 0,2-0,8 мкм). Если повторно будет получен

положительный результат, то необходимо подтвердить его с помощью подтверждающей тест-системы.

- При сообщении результатов из лаборатории в другие подразделения следует предпринимать меры для исключения ошибок при передаче данных.

- Устанавливать диагноз «вирусный гепатит» и доводить его до сведения пациента должен персонал, имеющий высшее медицинское образование и соответствующую специальную квалификацию.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных.

ОП репликатов Отрицательного контроля (ед.опт.плотн.): 0,012 ; 0,008 ; 0,010

Среднее значение ОП ОК (ед.опт.плотн.): 0,010

Критерий достоверности ($< 0,050$) Выполняется

ОП Положительного контроля (ед.опт.плотн.): 2,489

Критерий достоверности ($> 1,000$) Выполняется

Cut-Off = $0,010 + 0,050 = 0,060$

ОП репликатов Калибратора (ед.опт.плотн.): 0,350 ; 0,370

Среднее значение (ед.опт.плотн.): 0,360

ОП/ Cut-off: $0,360/0,060 = 6$

Отношение ОП/Cut-off $> 2,0$ Выполняется

ОП Образца 1: 0,028 ед.опт.плотн.

ОП Образца 2: 1,690 ед.опт.плотн.

Для Образца 1 ОП/Cut-off $< 0,9$ - Образец считается отрицательным

Для Образца 2 ОП/Cut-off $> 1,1$ - Образец считается положительным

9.2. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

Описание	Условие
Blank	$< 0,100$
Отрицательный контроль	$< 0,050$
ОП Калибратора 10мМЕ/мл (ВОЗ)	ОП/Cut-off $> 2,0$
Положительный контроль	$> 1,000$

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

При несоответствии критериям следует немедленно известить руководство лаборатории. Некоторые возможные причины несоответствий приведены ниже. Перед повторным проведением анализа следует убедиться, что эти причины устранены.

Описание дефекта	Возможная причина
ОП в лунке для обнуления >0,100	Раствор ТМБ был загрязнен в процессе анализа.
ОП Отрицательного контроля >0,050	1. Не были предварительно подобраны оптимальные параметры промывки и/или настройки промывочного устройства; 2. Использован неподходящий промывочный буфер либо магистрали промывочного устройства не были промыты соответствующим буфером перед началом работы; 3. Ошибка оператора в процессе внесения контролей (положительный контроль вместо отрицательного); 4. Контаминация флакона с Отрицательным контролем, либо лунок, в которые он был внесен, следами положительных образцов или Конъюгата; 5. Загрязнение пипеток следами положительных образцов или Конъюгата; 6. Закупоренные или засоренные иглы автоматического промывочного устройства.
Калибровочная проба: отношение ОП/Cut-off <2,0	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Калибровочной пробы (например, вместо нее внесен Отрицательный контроль); 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Калибровочной пробы.
ОП Положительного контроля <1,000	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Положительного контроля; 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Положительного контроля.

9.3. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию HBsAg.
- Реактивные образцы признают положительными по содержанию HBsAg.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 6 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Повторяющиеся ложноположительные результаты «свежих» образцов встречаются в менее, чем 0,1% случаев и чаще всего связаны с высоким титром НАМА. Интерференция в «свежих» образцах возможна также, если они содержат включения или в процессе их обработки была нарушена методика.

Влияние интерферирующих факторов почти полностью исключается, если анализ проводится по альтернативной (двустадийной) методике.

СХЕМА АНАЛИЗА

- Промывка: 1 раз.

Реагенты	Лунки	Blank	CONTROL -	CAL	CONTROL +	Образцы
CONTROL -		-----	150 мкл	-----	-----	-----
CAL		-----	-----	150 мкл	-----	-----
CONTROL +		-----	-----	-----	150 мкл	-----
Образцы		-----	-----	-----	-----	150 мкл
Конъюгат CONJ		-----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл

- Инкубация: 37°C, 120 мин.
- Промывка: 4-5 x 350 мкл.

Раствор ТМБ ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: комнатная температура, 30 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм).

Примерная схема нанесения образцов на микропланшет:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	ОБ2										
B	K(-)	ОБ3										
C	K(-)	ОБ4										
D	K(-)	ОБ5										
E	КП	ОБ6										
F	КП	ОБ7										
G	K(+)	ОБ8										
H	ОБ1	ОБ9										

Условные обозначения:

BLK = лунка для обнуления (Blank)

K(-) = отрицательный контроль

КП = калибровочная проба

K(+) = положительный контроль

ОБ - образцы

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 11 (оригинал) лист 06

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
_____ М.В. Швырев



НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И/ИЛИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М К АНТИГЕНУ ЯДРА ВИРУСА ГЕПАТИТА В В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА HBc IgM

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Определение антител против корового антигена вируса гепатита В (анти-HBc) в сыворотке или плазме крови человека играет важную роль в мониторинге ВГВ инфекции. Обычно анти-HBc антитела появляются в крови после HBsAg и остаются в ней после исчезновения последнего. Присутствие IgM анти-HBc во время ранней стадии заболевания указывает на первичный иммунный ответ на ВГВ. Эти антитела очень полезно определять в фазу так называемого «окна» ВГВ инфекции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе реагентов реализован двустадийный «capture»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Если в образце присутствуют иммуноглобулины класса М, то во время первой инкубации они связываются с антителами специфичными к IgM человека. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Если среди связавшихся IgM присутствуют антитела к соответствующему возбудителю, то во время следующей стадии анализа они связываются с комплексом специфический антиген-антитело, конъюгированные с пероксидазой хрена. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству специфических IgM в анализируемых пробах. Наличие IgM оценивают относительно значения cut-off.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
Планшет MTP	1x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	Концентрат Конс.
Раствор для разведения образцов DIL	1 x 100 мл	Готов к использованию Ready for use
Отрицательный контроль NEG	1 x 1,0 мл	Готов к использованию Ready for use
Положительный контроль POS	1 x 1,0 мл	Готов к использованию Ready for use
Антиген Ag	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок). Лунки стрипов планшета покрыты моноклональными антителами к IgM человека.

Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

- **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, не содержащий HBsAg, антитела к вирусу гепатита С и ВИЧ. Готов к использованию. Консервант: азид натрия (<0,1%).
- **Положительный контроль (POS) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови содержащий HBsAg и IgM к коровому антигену вируса гепатита В и не содержащий антитела к вирусу гепатита С и ВИЧ. Готов к использованию. Консервант: азид натрия (<0,1%).
- **Антиген (Ag) / Antigen (HBsAg):** 1 флакон. Раствор на основе трисового буфера, содержащий БСА и рекомбинантный HBsAg. Готов к использованию. Консервант: неомицин.
- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон. Раствор на основе трисового буфера содержит моноклональные антитела к HBsAg, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), и БСА. Готов к использованию. Консервант: неомицин.
- **Раствор для разведения (DIL) / Sample Diluent:** 1 флакон. Буферный раствор белков. Готов к использованию. Консервант: азид натрия (<0,1%).
- **Промывочный раствор (WASH) / Washing Solution (concentrated):** 1 флакон. Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: Тимеросал (< 0.05%). Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:10. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 суток при +2...8°C. **Реагент общий для продуктов линий «HEPATITIS B» производства компании RADIM.**
- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе более 500 образцов, полученных от доноров крови и пациентов не имеющих ВГВ инфекции. Специфичность составляет ≥98%.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе более 200 положительных образцов. Чувствительность составляет ≥98%.

3.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как способность анализа точно выявлять специфический анализ в присутствии интерферирующих факторов в матрике образца. Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина), аутоантител или родственных вирусов. Дополнительные исследования, проведенные на сыворотках беременных женщин, показали, что качество анализа не изменяется под действием интерферирующих агентов.

3.4 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность определялась с помощью референсной панели на Анти-HBc IgM, полученной из института Пауля Эрлиха. Аналитическая чувствительность составила 52 МЕ/мл.

3.5 Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией иммуноглобулинов класса М против HbсAg. Для того чтобы перевести качественный результат в количественный параметр, оптическую плотность (ОП), полученную для образцов, делили на значение Cut-off, получая, таким образом, значение S/CO (сигнал/ Cut-off).

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	±	S.D.	C.V.	Кол-во репликатов
	S/CO			%	
a	0,08	±	0,02	21,7	10
b	1,22	±	0,15	12,5	10
c	10,84	±	0,27	2,6	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее значение	±	S.D.	C.V.	Кол-во постановок
	S/CO			%	

a	1,31	±	0,09	6,91	10
b	3,29	±	0,23	6,9	10
c	10,58	±	0,99	9,3	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты разных серий набора (см. п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Смешивание общих реагентов разных серий (см. п.2.2.1.) допускается.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. При необходимости более длительного хранения образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

Перед проведением анализа разведите образцы в соотношении 1:51 с помощью Раствора для разведения. Например: 10 мкл образца + 500 мкл Раствора для разведения.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки. Оставьте 2 лунки для обнуления (Blank).

7.2. Внесите **по 10 мкл** контролей (отрицательный контроль в тетрапликате, положительный в дубликате) и образцов в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Внесите во все лунки **по 200 мкл** Раствора для разведения образцов, исключая лунки Blank.

7.4. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора).

7.5. Инкубируйте его в течение **60 ± 2 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$** .

7.6. Удалите содержимое лунок и промойте лунки **4 раза**, внося при каждой промывке **по 350 мкл** разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.7. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Антигена, исключая лунки Blank.

7.8. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Конъюгата, исключая лунки Blank.

7.9. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора).

7.10. Инкубируйте его в течение **60 ± 5 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$** .

7.11. Удалите содержимое лунок и промойте лунки **4 раза**, внося при каждой промывке **по 350 мкл** разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.12. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Раствора ТМБ.

7.13. Инкубируйте в течение **20 ± 2 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$** . Избегайте прямого попадания солнечного света на планшет.

7.14. Внесите во все лунки **по 100 мкл** Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при двух длинах волн 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов

проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить область кривой.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Определите среднее значение оптической плотности (ОП) Отрицательного Контроля (ОК) и Положительного контроля (ПК). Рассчитайте значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = \text{ОП}_{\text{срОК}} + 0,300$$

Присутствие или отсутствие IgM против HBcAg определяется путем сравнения ОП образца со значением Cut-off.

Образцы с ОП ниже Cut-off признают нереактивными (не содержащими IgM против HBcAg).

Образцы с ОП выше Cut-off признают реактивными (содержащими IgM против HBcAg) и требуют повторного тестирования для подтверждения положительного результата. Если при повторном тестировании получен отрицательный результат, образец признается не реактивным. Если же при повторном тестировании получен положительный результат, образец признается реактивным.

Область значений ОП $\pm 10\%$ от Cut-off является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требует повторного тестирования для подтверждения.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных данных.

ОП репликаторов Отрицательного контроля (ед.опт.плот.): 0,036 – 0,040 – 0,038 – 0,046

Среднее значение: 0,040

Критерий достоверности ($< 0,070$) Выполняется

ОП Положительного контроля (ед.опт.плот.): 1,020 – 1,080

Среднее значение: 1,050

Критерий достоверности ($> 0,500$) Выполняется

$$\text{Cut-Off} = 0,040 + 0,300 = 0,340$$

9.2. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям.

Описание	Условие
ОП Отрицательного контроля при 450 нм	$< 0,070$
ОП Положительного контроля при 450 нм	$> 0,500$

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

9.3. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию IgM против HBcAg.
- Реактивные образцы признают положительными по содержанию IgM против HBcAg.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Реагенты	Лунки	Blank	NEG	POS	Образцы
NEG		-----	10 мкл	-----	-----
POS		-----	-----	10 мкл	-----
Образцы		-----	-----	-----	10 мкл
DIL		-----	200 мкл	200 мкл	200 мкл

– Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 60 ± 5 мин.

– Промывка: 4 x 350 мкл.

Антиген Ag	-----	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Конъюгат CONJ	-----	100 мкл	100 мкл	100 мкл

– Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 60 ± 5 мин.

– Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB	200 мкл	200 мкл	200 мкл	200 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------

– Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 20 ± 2 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм.

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

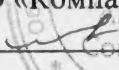
Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 6 (шесть) лист сб

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
 М.В. Швырев



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ЯДРУ ВИРУСА ГЕПАТИТА В
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
HBcAb**

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Определение антител против корового антигена вируса гепатита В (анти-HBc) играет важную роль в мониторинге ВГВ инфекции. Обычно анти-HBc антитела появляются в крови после HBsAg и остаются в ней после исчезновения последнего. Таким образом, в фазу так называемого «окна» анти-HBc антитела являются единственным серологическим маркером ВГВ. В крови пациента с ВГВ инфекцией определяются как Ig M так и IgG антитела к коровому белку. Ig M антитела появляются первыми, их концентрация достигает пика во время острой фазы инфекционного процесса. IgG антитела остаются в крови годами, не смотря на отсутствие симптомов ВГВ.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе реагентов реализован двустадийный вариант конкурентного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использован HBcAg, который иммобилизован на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок). В лунках, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание специфических антител, содержащихся в исследуемом образце. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время второй инкубации в лунки добавляют анти-HBcAg антитела, конъюгированные с пероксидазой, которые связывают «свободный» (не связанный антителами исследуемого образца) антиген твердой фазы. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации специфических антител в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках наличие специфических иммуноглобулинов оценивают относительно значения cut-off.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество		Состояние
	1-й вариант комплектации	2-й вариант комплектации	
Планшет MTP	1x 96 лунок	2x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
Промывочный раствор WASH	1 x 50 мл	2 x 50 мл	Концентрат Conc.
Отрицательный контроль NEG	1 x 2,5 мл	1 x 2,5 мл	Готов к использованию Ready for use
Положительный контроль POS	1 x 1,5 мл	1 x 1,5 мл	Готов к использованию Ready for use
Конъюгат CONJ	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	2 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 или на 192 лунки.

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MTP) / Coated microplate:** 1 или 2 планшета из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок). Лунки стрипов планшета покрыты рекомбинантным HBcAg.

Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

- **Отрицательный контроль (NEG) / Negative Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, не содержащий HBsAg, антитела к вирусу гепатита С и ВИЧ. Готов к использованию. Консерванты: неомидин и тимеросал (<0,05%).
- **Положительный контроль (POS) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор на основе сыворотки крови, содержащий IgG к коровьему антигену вируса гепатита В и не содержащий HBsAg, антитела к вирусу гепатита С и ВИЧ. Готов к использованию. Консерванты: неомидин и тимеросал (<0,05%).
- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон или 2 флакона. Раствор на основе трисового буфера, содержит моноклональные IgG к HBsAg, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO) и БСА. Готов к использованию. Консервант: неомидин.
- **Промывочный раствор (WASH) / Washing Solution (concentrated):** 1 флакон или 2 флакона. Фосфатный буферный раствор, содержащий Твин 20. Консервант: Тимеросал (< 0.05%). Перед использованием развести концентрат в 500 мл дистиллированной воды. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 30 дней при +2...8°C. **Реагент, общий для продуктов линий «HEPATITIS В» производства компании RADIM.**
- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон или 2 флакона. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон или 2 флакона. 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность данного метода оценивалась на группе более 5000 образцов, полученных от доноров крови и пациентов, не имеющих ВГВ инфекции. Специфичность составляет 99,86%.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность данного метода оценивалась на группе более 400 положительных образцов. Чувствительность составляет 100%.

3.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как способность анализа точно выявлять специфический аналит в присутствии интерферирующих факторов в матриксе образца. Контрольные исследования показали, что характеристики анализа не изменяются под действием антикоагулянтов (соли ЭДТА и гепарина), аутоантител или родственных вирусов. Дополнительные исследования, проведенные на сыворотках беременных женщин, показали, что качество анализа не изменяется под действием интерферирующих агентов.

3.4 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выражается минимальным количеством определяемого аналита, выявляемым с помощью данного метода. Аналитическая чувствительность определялась с помощью серии разведений Международного Стандарта (МС) на Анти-НВс антитела, полученного из института Пауля Эрлиха (Германия). Концентрация МС была выражена в МЕ/мл. Аналитическая чувствительность составила 0,45 МЕ/мл.

Концентрация Анти-НВс	ОП, ед.опт.пл.
2,5 МЕ/мл	0,120
1,25 МЕ/мл	0,121
0,625 МЕ/мл	0,302
0,312 МЕ/мл	0,685
Отрицательный контроль	1,899
Положительный контроль	0,166
Cut-off	0,379

3.5 Прецизионность

Прецизионность оценивалась на анализаторе производства RADIM посредством определения повторяемости и воспроизводимости анализа (внутри- и межаналитический коэффициенты вариации) на трех сыворотках с различной концентрацией антител против НВсAg. Для того, чтобы перевести качественный результат в количественный параметр, оптическую плотность (ОП), полученную для образцов, делили на значение Cut-off, получая, таким образом, значение S/CO (сигнал/ Cut-off).

Повторяемость (Внутрианалитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее ± S.D.			C.V. %	Кол-во репликатов
	S/CO				
a	0,07	±	0,02	31,5	10
b	0,94	±	0,05	5,7	10
c	3,97	±	0,13	3,4	10

Воспроизводимость (Межаналитический коэффициент вариации)

Сыворотка	Среднее $\pm$ S.D.			C.V. %	Кол-во постановок
	значение	S/CO			
a	0,3	$\pm$	0	11,6	10
b	1,4	$\pm$	0,1	8,6	10
c	3,3	$\pm$	0,3	9,6	10

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте реагенты разных серий набора (см. п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
 - Смешивание общего реагента разных серий (см. п.2.2.1.) допускается.
 - Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
 - Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
 - Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
 - Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
 - Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
 - Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
 - Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
 - В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
 - Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
 - Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
 - Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
 - Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
 - Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.
- Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:**
- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
 - Не разрешается пипетировать ртом.
 - Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

– Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

– Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

– Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

– Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Данный набор может применяться для исследования образцов сыворотки и плазмы крови человека. Сильно гемолизированные или липемичные образцы, а также присутствие в образцах фибрина могут оказывать влияние на результаты анализа. Перед постановкой анализа следует убедиться в том, что образцы прозрачные и не содержат осадка. Допускается хранение образцов при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение 1 недели. При необходимости более длительного хранения образцы следует заморозить при -20°C . Избегайте повторного оттаивания и замораживания образцов.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18...25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки. Оставьте 2 лунки для обнуления (Blank).

7.2. Внесите по 100 мкл контролей (отрицательный контроль в тетрапликате, положительный в дубликате) и образцов в соответствующие лунки.

7.3. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора).

7.4. Инкубируйте его в течение 60 ± 2 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

7.5. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза, внося при каждой промывке по 350 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.6. Внесите во все лунки по 100 мкл Конъюгата, исключая лунки Blank.

7.7. Закройте планшет клейкой бумагой (входит в состав набора).

7.8. Инкубируйте его в течение 30 ± 2 минуты при $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

7.9. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза, внося при каждой промывке по 350 мкл разведенного Промывочного раствора. Тщательно удалите жидкость из лунок.

7.10. Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора ТМБ.

7.11. Инкубируйте в течение 20 ± 2 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Избегайте попадания света на планшет.

7.12. Внесите во все лунки по 100 мкл Стоп-реагента.

* При использовании автоматического анализатора производства RADIM и/или SEAC, действуйте в соответствии с его инструкцией.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 6.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм, что позволит расширить область кривой.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Определите среднее значение оптической плотности (ОП) Отрицательного Контроля (ОК) и Положительного контроля (ПК).

Примечание: для расчета среднего значения ОП ОК не использовать оптические плотности лунок, которые не попадают в диапазон 0,8 - 1,2 от ОП_{ср.ОК}.

Рассчитайте значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = \text{ОП}_{\text{ср.ОК}} \times 0,2 \quad (1)$$

Присутствие или отсутствие антител против HBsAg определяется путем сравнения ОП образца со значением Cut-off.

Образцы с ОП выше Cut-off признают нереактивными (не содержащими антитела против HBsAg).

Образцы с ОП ниже Cut-off признают реактивными (содержащими антитела против HBsAg) и требуют повторного тестирования для подтверждения положительного результата. Если при повторном тестировании получен отрицательный результат, образец признается нереактивным. Если же при повторном тестировании получен положительный результат, образец признается реактивным.

Область значений ОП $\pm 10\%$ от Cut-off является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным и требует повторного тестирования для подтверждения.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных данных.

ОП репликатов Отрицательного контроля (ед.опт.плотн.): 2,070 ; 2,105 ; 2,120 ; 2,205

Среднее значение ОП ОК (ед.опт.плотн.): 2,125

ОП Положительного контроля (ед.опт.плотн.): 0,168 ; 0,180

Среднее значение ОП ПК (ед.опт.плотн.): 0,174

Cut-Off = $2,125 \times 0,2 = 0,425$

9.2. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию антител против HBsAg.
- Реактивные образцы признают положительными по содержанию антител против HBsAg.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Результаты анализа должны интерпретироваться с осторожностью и подтверждаться клиническими данными и дальнейшей диагностикой.

СХЕМА АНАЛИЗА

Реагенты	Лунки	Blank	NEG	POS	Образцы
NEG		----	100 мкл	----	----
POS		----	----	100 мкл	----
Образцы		----	----	----	100 мкл

– Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 60 ± 5 мин.

– Промывка: 4 x 350 мкл.

Конъюгат CONJ		----	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------------	--	------	---------	---------	---------

– Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 30 ± 2 мин.

– Промывка: 4 x 350 мкл.

Раствор ТМБ TMB		100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	--	---------	---------	---------	---------

– Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 20 ± 2 мин.

Стоп-реагент STOP		100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	--	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм.

Генеральный директор
ОО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ОО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 6 (шесть) лист об

Генеральный директор
ООО «Компания Адкор Био»
М.В. Швырев



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 12 » июля 2011 г.



**НАБОР РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К
ВИРУСУ ГЕПАТИТА А В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
HAV Ab**

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Центр по контролю за заболеваниями (CDC), Атланта, США, описывает ситуацию, сложившуюся с Гепатитом А, следующим образом:

Гепатит А продолжает оставаться наиболее часто встречающимся заболеванием из числа тех, для профилактики которых используется вакцина. И это несмотря на то, что вакцинопрофилактика гепатита А проводится с 1995 года. Вакцинация восприимчивого населения способна в значительной степени уменьшить количество случаев заболевания и, возможно, остановить распространение Гепатита А.

Вирус Гепатита А (ВГА) – РНК-содержащий вирус размером 27 нм, относящийся к пикорнавирусам. Инкубационный период в среднем 28 дней (может варьировать от 15 до 50 дней), заболевание протекает как бессимптомно, так и с ярко выраженной клиникой. Для ВГА инфекции характерно острое начало, сопровождающееся следующими симптомами: лихорадка, слабость, отсутствие аппетита, тошнота, боли в животе, темная моча и желтуха. Выраженность симптомов зависит от возраста больного. У детей младше 6 лет в большинстве (70%) случаев ВГА инфекция протекает бессимптомно и обычно не сопровождается желтухой. У более старших детей и взрослых инфекция обычно протекает с ярко выраженной клиникой и в более 70% случаев сопровождается желтухой. Выздоровление обычно наступает в течение 2 месяцев, однако у 10-15% больных период реконвалесценции растягивается до 6 месяцев.

Вирус Гепатита А реплицируется в печени, выделяется с желчью, попадает в кал и таким образом выделяется из организма инфицированного человека. Наиболее заразен больной человек в течение двух недель до возникновения желтухи или повышения уровня печеночных ферментов, когда концентрация вируса в стуле максимальная. После появления желтухи концентрация вируса в стуле снижается. Дети и подростки могут выделять вирус в течение более долгого времени (до нескольких месяцев после возникновения симптомов заболевания), чем взрослые. Хроническое выделение вируса гепатита А не встречается, однако такое возможно у пациентов с рецидивом инфекции. Виремия наблюдается вскоре после заражения и сохраняется вплоть до повышения уровня печеночных ферментов.

Дифференциальная диагностика с другими видами вирусных гепатитов на основе клинической картины или эпидемиологического анамнеза невозможна. Поэтому определение иммуноглобулинов М к капсидному белку ВГА необходимо для подтверждения диагноза «острая ВГА-инфекция». У большинства пациентов анти-ВГА IgM можно определить за 5-10 дней до появления симптомов, и они могут сохраняться в крови в течение 6 месяцев. Анти-ВГА IgG появляются в крови после проявления клинической картины и остаются в течение всей жизни человека, формируя пожизненный иммунитет против ВГА. Коммерческие тест-системы в основном направлены на выявление IgM и суммарных антител (IgM и IgG) против вируса гепатита А в сыворотке крови человека.

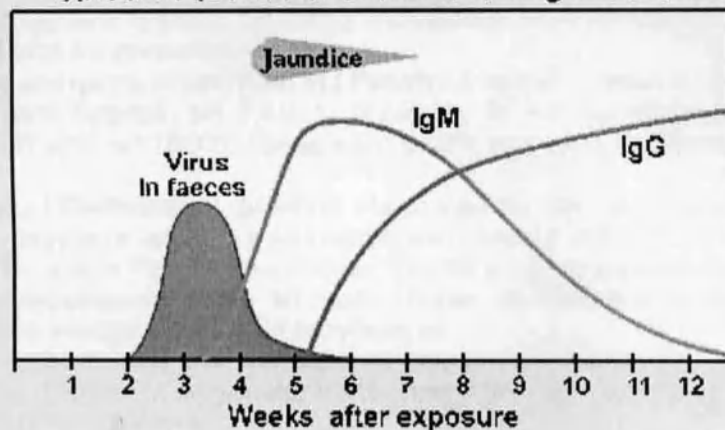
РНК ВГА может быть определена с помощью ПЦР в крови и кале у пациентов во время острой фазы. Определение последовательности РНК позволяет отнести вирус к тому или иному изоляту.

ВГА передается фекально-оральным путем, через зараженную пищу и воду. В редких случаях, возможно заражение трансмиссивным путем при переливании крови или ее продуктов, полученных от донора с ВГА вирусемией. У зараженных лабораторных животных (приматов) ВГА определялся в слюне во время инкубационного периода, однако возможность передачи инфекции через слюну показана не была.

В зависимости от условий, ВГА может быть стабилен в окружающей среде в течение нескольких месяцев. Прогрев пищи при температуре 85°C в течение 1 минуты и обработка поверхности 1:100 разведением гипохлорита натрия в водопроводной воде необходимы для инактивации ВГА.

Так как для большинства детей характерно бессимптомное течение инфекции, они играют важную роль в распространении инфекции. В одном из исследований, у 52 % взрослых без идентифицированного источника заражения имелись дети младше 6 лет, поэтому наличие в доме детей младшего возраста было связано с распространением ВГА инфекции. При серологическом тестировании детей, бывших в контакте с взрослыми, инфицированными ВГА, было показано, что 25-40% из них имели IgM к вирусу гепатита А.

Hepatitis A typical sequence of events following infection



Тест-система HAV Ab предназначена для качественного определения иммуноглобулинов против ВГА в сыворотке и плазме крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе реагентов реализован двустадийный вариант конкурентного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использован очищенный антиген ВГА, который иммобилизован на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок). В лунках, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание специфических антител, содержащихся в исследуемом образце. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время второй инкубации в лунки добавляют специфические антитела, конъюгированные с пероксидазой, которые связывают «свободный» (не связанный антителами исследуемого образца) антиген твердой фазы. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна количеству специфических антител в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках наличие специфических иммуноглобулинов оценивают относительно значения cut-off.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
MICROPLATE Микропланшет	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
CONTROL - Отрицательный контроль	1 x 4,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CONTROL + Положительный контроль	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CAL Калибровочная проба	2 флакона	Лиофилизированный препарат
WASHBUF 20X 20x Промывочный буфер	1 x 50 мл	Концентрированный раствор Conc.
CONJ Конъюгат	1 x 16 мл	Готов к использованию Ready for use
DILSPE Раствор для разведения образцов	1 x 8,0 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Реагенты

- Иммуносорбент – планшет (MICROPLATE) / Microplate: 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок). Лунки стрипов планшета покрыты инактивированным вирусом гепатита А.

Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

- **Отрицательный контроль (CONTROL -) / Negative Control:** 1 флакон. Раствор бледно-желтого цвета на основе 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4±0,1, содержит БСА. Консерванты: 0,02% гентамицина сульфат и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.

- **Положительный контроль (CONTROL +) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор зеленого цвета на основе 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4±0,1, содержит БСА и антитела к вирусу гепатита А в концентрации выше, чем 100 мМЕ/мл (ВОЗ). Консервант: 0,02% гентамицина сульфат и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.

- **Калибратор (CAL) / Calibrator:** 2 флакона. На основе 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4±0,1, содержит БСА и антитела к вирусу гепатита А в концентрации около 10 мМЕ/мл (ВОЗ). Консерванты: 0,02% гентамицина сульфат и 0,1% Катон GC. Лиофилизирован. Перед использованием растворите содержимое флакона в объеме дистиллированной воды, который указан на этикетке. Восстановленный реагент хранить при -20°C. Повторное замораживание не допускается.

Внимание: Объем, необходимый для растворения содержимого флакона, может быть различным для разных партий реагента. Обратите внимание, чтобы препарат был растворен именно в том объеме воды, который указан на этикетке флакона.

- **Промывочный раствор 20x (WASHBUF 20X) / Washing buffer concentrate:** 1 флакон. 1x Промывочный буфер представляет собой 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7,0±0,2, содержащий 0,05% Твин 20 и 0,05% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 7 суток при +2...8°C.

- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон. Раствор красного цвета на основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,8±0,1, содержит антитела к вирусу гепатита А, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), 2% БСА, 0,02% гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.

- **Раствор для разведения образцов (DILSPE) / Specimen Diluent:** 1 флакон. Раствор темно-зеленого цвета. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.

- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.

- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.

- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**

- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определялась на панели образцов, полученных от доноров и пациентов, не имеющих иммунитета к ВГА, которые были определены как отрицательные одобренной FDA тест-системой.

Не было обнаружено ложноположительных реакций при тестировании анализируемых образцов разных типов.

Не было также обнаружено влияния на специфичность заморозки анализируемых образцов.

Были протестированы образцы пациентов с другими вирусными заболеваниями (ВГС, ВГД, ВГВ, ВИЧ) и с гепатитами невирусной природы. Ложноположительных реакций обнаружено не было.

В общей сложности в независимых референсных лабораториях было протестировано более 1000 образцов. Диагностическая специфичность составила > 98%.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определялась на панели образцов, которые были определены как положительные одобренной FDA тест-системой. В общей сложности было протестировано более 200 образцов. Диагностическая чувствительность составила 100%.

Дополнительно были протестированы сероконверсионные панели и панель для определения качества тест-системы (BBI, США). Результаты, полученные при тестировании двух панелей, представлены в нижеследующих таблицах.

Сероконверсионная панель: PNT 902

Образец	ОП, 450 нм	CO/S	S/CO	DiaSorin
Отрицательный контроль	1,968	0,3	2,89	
Положительный контроль	0,084	8,1	0,12	
Калибратор	0,470	1,5	0,69	
PNT 902				
1	1,878	0,4	2,76	отрицательный
2	1,501	0,5	2,20	отрицательный
3	0,090	7,6	0,13	положительный
4	0,123	5,6	0,18	положительный

5	0,120	5,7	0,176	положительный
---	-------	-----	-------	---------------

Панель для определения качества тест-системы: РНТ 201

Образец	ОП, 450 нм	CO/S	S/CO	DiaSorin	Образец	ОП, 450 нм	CO/S	S/CO	DiaSorin
1	0,169	4,0	0,24	пол	14	0,139	4,9	0,20	пол
2	0,132	5,2	0,19	пол	15	0,115	5,9	0,16	пол
3	0,143	4,8	0,20	пол	16	0,167	4,1	0,24	пол
4	0,104	6,6	0,15	пол	17	0,086	8,0	0,12	пол
5	0,438	1,6	0,63	пол	18	0,160	4,3	0,23	пол
6	0,121	5,7	0,17	пол	19	0,175	3,9	0,25	пол
7	0,127	5,4	0,18	пол	20	1,772	0,4	2,58	отр
8	0,150	4,6	0,21	пол	21	0,090	7,6	0,13	пол
9	0,115	5,9	0,16	пол	22	0,201	3,4	0,29	пол
10	0,094	7,3	0,13	пол	23	0,281	2,4	0,40	пол
11	0,070	9,8	0,10	пол	24	0,134	5,1	0,19	пол
12	1,814	0,4	2,64	отр	25	0,142	4,8	0,20	пол
13	0,097	7,1	0,14	пол	OK	1,780	0,4	2,59	отр

3.3 Прецизионность

Два образца (один отрицательный и один слабоположительный) анализировались в трех независимых постановках. В каждой из постановок образцы были нанесены в 16 репликатах. Результаты, полученные при изучении прецизионности, представлены в нижеследующих таблицах.

Постановка 1

Образец	Отрицательный	Слабоположительный
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	2,425	0,608
Ст. откл.	0,065	0,023
КВ, %	2,7	3,9

Постановка 2

Образец	Отрицательный	Слабоположительный
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	2,373	0,573
Ст. откл.	0,107	0,034
КВ, %	4,5	6,0

Постановка 3

Образец	Отрицательный	Слабоположительный
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	2,478	0,554
Ст. откл.	0,108	0,023
КВ, %	4,4	4,2

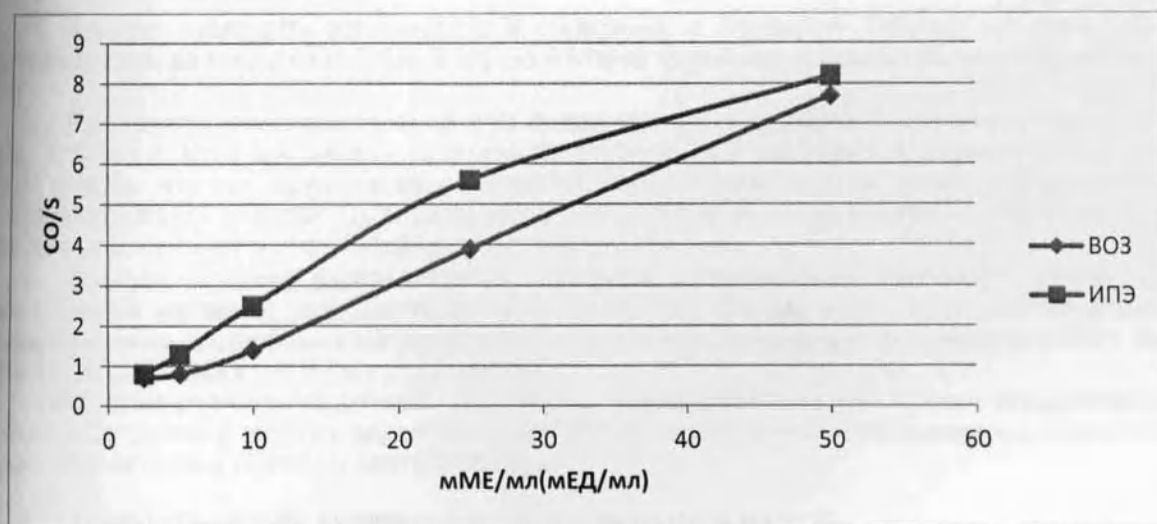
Изменения диагнозов образцов обнаружено не было.

3.4 Предел детекции

Этот параметр был определен с помощью Второго Международного Стандарта антител и Стандарта, полученного из института Пауля Эрлиха. Дополнительно были протестированы контрольные образцы, полученные из Boston Biomedica Inc., США (Accurun 52 и Accurun 120). Предел детекции составляет < 10 ВОЗ мМЕ/мл или < 5 ИПЭ мЕд/мл. Результаты контроля качества представлены в нижеследующей таблице.

ВОЗ мМЕ/мл	ОП, 450 нм	CO/S	S/CO	ИПЭ мЕд/мл	ОП, 450 нм	CO/S	S/CO
50	0,099	7,7	0,13	50	0,093	8,2	0,12
25	0,197	3,9	0,25	25	0,137	5,6	0,17
10	0,543	1,4	0,71	10	0,304	2,5	0,39
5	0,943	0,8	1,23	5	0,587	1,3	0,76
2,5	1,015	0,7	1,33	2,5	0,949	0,8	1,24
OK	2,217	----	----	OK	2,217	----	----
Accurun 52	0,060	12,7	0,078	Accurun 120	0,115	6,6	0,15

На графике это выглядит следующим образом:



4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты (см. 2.2.1.) разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

– Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

– Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

– Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Используемый при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

– Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке

- Микropипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

– При заборе венозной крови следует соблюдать правила асептики. Сыворотку или плазму крови получают по общепринятой методике подготовки образцов для лабораторного анализа. Не было обнаружено существенного влияния цитрата, ЭДТА и гепарина на результаты анализа.

– Не допускается добавление в анализируемые образцы консервантов, особенно азид натрия, так как они могут повлиять на ферментативную активность конъюгата и способствовать возникновению ложноотрицательных результатов.

– Образцы должны быть четко маркированы во избежание ошибочной интерпретации результатов. Настоятельно рекомендуется применять штрих-кодирование и электронный датчик для считывания штрих-кода, в особенности, если набор применяется для скрининга донорской крови.

– Не допускается применять образцы с видимыми признаками гемолиза (красный цвет) и липемии («молочный» оттенок), так как при этом может быть получен ложный результат. По этой же причине не допускается применять образцы, содержащие фибрин, твердые частицы или видимые признаки микробной контаминации.

– Сыворотку и плазму допускается хранить при температуре $+2^\circ\text{C}$.. $+8^\circ\text{C}$ в течение 5 суток после сбора. При необходимости более длительного хранения образцы допускается хранить при температуре -20°C в течение нескольких месяцев. Не допускается повторное замораживание/размораживание образцов, так как образовавшиеся при этом включения могут влиять на результат анализа.

– При обнаружении твердых частиц, образцы перед проведением анализа центрифугируют в течение 20 минут при 2000 об/мин, либо очищают фильтрованием (диаметр пор фильтра 0,2-0,8 мкм).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18^\circ\text{C}$.. $+25^\circ\text{C}$).

– Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank), 3 лунки для отрицательного контроля, 2 лунки для калибратора и одну лунку для положительного контроля.

7.2. Внесите во все лунки с образцами, Контролями и Калибратором по 50 мкл Раствора для разведения образцов.

7.3. Внесите по 100 мкл контролей в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.4. Внесите по 100 мкл анализируемых образцов.

Примечание: Убедитесь, что образцы были действительно добавлены в лунки.

7.5. Инкубируйте планшет в течение 60 минут при 37°C.

Примечание: Стрипы следует заклеивать специальной пленкой, входящей в состав набора, только в том случае, если анализ проводится вручную. При автоматической постановке анализа клейкая пленка не требуется.

7.6. Удалите содержимое лунок и с помощью автоматического промывочного устройства, промойте микропланшет 4–5 раз подготовленным к работе Промывочным раствором. При каждой промывке добавляйте по 350 мкл Промывочного раствора в каждую лунку.

7.7. Внесите во все лунки, кроме лунки A1, по 100 мкл Конъюгата. Убедитесь, что окрашенный раствор внесен во все необходимые лунки. Заклейте планшет клейкой пленкой.

Примечание: Во время внесения Конъюгата избегайте прикасаться наконечником пипетки к внутренней стороне лунок во избежание контаминации.

7.8. Инкубируйте микропланшет в течение 60 минут при +37±2°C.

7.9. Удалите содержимое лунок и промойте лунки, как описано в п. 7.6.

7.10. Внесите по 100 мкл Раствора ТМБ в каждую лунку, включая A1. Инкубируйте планшет при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 20 минут.

Примечание: Во избежание высокого фонового сигнала, не допускайте попадания света на планшет.

7.11. Остановите ферментативную реакцию добавлением 100 мкл Стоп-реагента в каждую лунку. Стоп-реагент следует вносить в лунки в той же последовательности, как и Раствор ТМБ. После внесения Стоп-реагента окраска Отрицательного контроля и отрицательных образцов изменится с голубой на желтую.

7.12. Измерьте оптическую плотность раствора в лунках на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Желательно также провести параллельное измерение при длине волны сравнения 620-630 нм. Для обнуления прибора (Blank) используйте лунку A1.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 9.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов

Определить среднюю оптическую плотность (ОП) Отрицательного контроля (OK). Рассчитать значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = (\text{ОП}_{\text{срOK}} + \text{ОП}_{\text{ПК}}) / 3$$

Примечание: Если расчет результатов проводится операционной системой автоматического анализатора, следует убедиться, что задана правильная формула для вычисления значения cut-off и последующего расчета результатов.

Присутствие или отсутствие антител против ВГА определяется путем деления значения Cut-off на ОП образца или наоборот.

Образцы, для которых при делении на Cut-off, получено значение:

- более 0,9 - признают нереактивными (не содержащими антитела против ВГЕ);
- менее 1,1 - признают реактивными (содержащими антитела против ВГЕ);
- 0,9 – 1,1- признают сомнительными.

Образцы, для которых при делении Cut-off на ОП образца получено значение:

- менее 0,9 - признают нереактивными (не содержащими антитела против ВГЕ);
- более 1,1- признают реактивными (содержащими антитела против ВГЕ);
- 0,9 – 1,1- признают сомнительными.

Отрицательный результат означает, что пациент не был инфицирован вирусом гепатита А.

У всех пациентов с сомнительным результатом следует повторить анализ через 1-2 недели.

Положительный результат анализа указывает на наличие инфекции вирусом гепатита А. Пациент должен получить соответствующую медицинскую помощь.

Примечания:

- Во избежание ошибок, интерпретацию результатов следует проводить под наблюдением руководителя лаборатории.
- При сообщении результатов из лаборатории в другие подразделения следует предпринимать меры для исключения ошибок при передаче данных.
- Устанавливать диагноз «вирусный гепатит» и доводить его до сведения пациента должен персонал, имеющий высшее медицинское образование и соответствующую специальную квалификацию.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных.

ОП репликатов Отрицательного контроля (ед.опт.плот.):	1,900 – 2,000 – 2,100
Среднее значение:	2,000
Критерий достоверности(> 0,750)	Выполняется
ОП Положительного контроля(ед.опт.плот.):	0,100
Критерий достоверности (< 0,600)	Выполняется
Cut-Off = (2,000+0,100) / 3 = 0,700	
ОП репликатов Калибратора(ед.опт.плот.):	0,400 – 0,360
Среднее значение:	0,380
Отношение Cut-off /ОП > 1,0	Выполняется
Отношение ОП/Cut-off < 1,0	Выполняется

ОП Образца 1(ед.опт.плот.): 0,050
ОП Образца 2(ед.опт.плот.): 1,900
Для Образца 1 Cut-off /ОП > 1,1; ОП/Cut-off < 1,1 Образец считается положительным
Для Образца 2 Cut-off /ОП < 0,9; ОП/Cut-off > 0,9 Образец считается отрицательным

9.2. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям.

Описание	Условие
Blank	< 0,100
Отрицательный контроль	> 0,750, КВ < 30%
ОП Калибратора 10МЕ/мл (ВОЗ)	Cut-off /ОП > 1,0 ОП/Cut-off < 1,0
Положительный контроль	< 0,600

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

При несоответствии критериям следует немедленно известить руководство лаборатории. Некоторые возможные причины несоответствия приведены ниже. Перед повторным проведением анализа следует убедиться, что эти причины устранены.

Описание дефекта	Возможная причина
ОП в лунке для обнуления >0,100	Раствор ТМБ был загрязнен в процессе анализа.
ОП Отрицательного контроля <0,750; КВ >30%	1. Не были предварительно подобраны оптимальные параметры промывки и/или настройки промывочного устройства; 2. Использован неподходящий промывочный буфер либо магистрали промывочного устройства не были промыты соответствующим буфером перед началом работы; 3. Ошибка оператора в процессе внесения контролей (положительный контроль вместо отрицательного); 4. Контаминация флакона с Отрицательным контролем, либо лунок, в которые он был внесен, следами положительных образцов или Конъюгата; 5. Загрязнение пипеток следами положительных образцов или Конъюгата; 6. Закупоренные или засоренные иглы автоматического промывочного устройства.
Калибровочная проба: отношение Cut-off /ОП <1,0 ОП/Cut-off >1,0	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Калибровочной пробы (например, вместо нее внесен Отрицательный контроль); 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Калибровочной пробы
ОП положительного контроля >0,600	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Положительного контроля; 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Положительного контроля.

9.3. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию антител против ВГА.
- Реактивные образцы признают положительными по содержанию антител против ВГА.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 3 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Бактериальная контаминация и термоинактивация могут сказаться на оптической плотности образцов, что приведет к неправильному определению уровня аналита.

Тест-система предназначена только для исследования индивидуальных образцов, не следует использовать в качестве анализируемого образца пулы.

Постановка диагноза не должна основываться на единичном лабораторном исследовании, следует принимать во внимание анамнез и результаты исследования другими методами.

СХЕМА АНАЛИЗА

Реагенты \ Лунки	Blank	CONTROL -	CAL	CONTROL +	Образцы
DILSPE	-----	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
CONTROL -	-----	100 мкл	-----	-----	-----
CAL	-----	-----	100 мкл	-----	-----
CONTROL +	-----	-----	-----	100 мкл	-----
Образцы	-----	-----	-----	-----	100 мкл

- Инкубация: 37±2 °C, 60 мин.
- Промывка: 4-5 x 350 мкл.

Конъюгат CONJ	-----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
---------------	-------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2 °C, 60 мин.
- Промывка: 4-5 x 350 мкл

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: комнатная температура (+18...25°C), 20 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм).

Примерная схема нанесения образцов на микропланшет:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	ОБ2										
B	K(-)	ОБ3										
C	K(-)	ОБ4										
D	K(-)	ОБ5										
E	КП	ОБ6										
F	КП	ОБ7										
G	K(+)	ОБ8										
H	ОБ1	ОБ9										

Условные обозначения:

BLK = лунка для обнуления (Blank)

K(-) = отрицательный контроль

КП = калибровочная проба

K(+) = положительный контроль

ОБ - образцы

генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

руководитель лаборатории разработки ИФА-систем

ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 10 (десять) листов

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев

«УТВЕРЖДАЮ

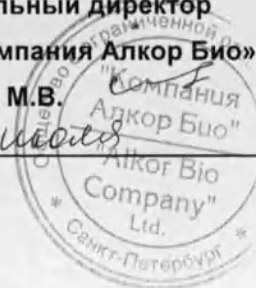
Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 11 »

Июль

2011г



**НАБОР РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М К
ВИРУСУ ГЕПАТИТА А В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
HAV IgM**

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Центр по контролю за заболеваниями (CDC), Атланта, США, описывает ситуацию, сложившуюся с Гепатитом А, следующим образом:

Гепатит А продолжает оставаться наиболее часто встречающимся заболеванием из числа тех, для профилактики которых используется вакцина. И это несмотря на то, что вакцинопрофилактика гепатита А проводится с 1995 года. Вакцинация восприимчивого населения способна в значительной степени уменьшить количество случаев заболевания и, возможно, остановить распространение Гепатита А.

Вирус Гепатита А (ВГА) – РНК - содержащий вирус размером 27 нм, относящийся к пикорнавирусам. Инкубационный период в среднем 28 дней (может варьировать от 15 до 50 дней), заболевание протекает как бессимптомно, так и с ярко выраженной клиникой. Для ВГА инфекции характерно острое начало, сопровождающееся следующими симптомами: лихорадка, слабость, отсутствие аппетита, тошнота, боли в животе, темная моча и желтуха. Выраженность симптомов зависит от возраста больного. У детей младше 6 лет в большинстве (70%) случаев ВГА инфекция протекает бессимптомно и обычно не сопровождается желтухой. У более старших детей и взрослых инфекция обычно протекает с ярко выраженной клиникой и в более 70% случаев сопровождается желтухой. Выздоровление обычно наступает в течение 2 месяцев, однако у 10-15% больных период реконвалесценции растягивается до 6 месяцев.

Вирус Гепатита А реплицируется в печени, выделяется с желчью, попадает в кал и таким образом выделяется из организма инфицированного человека. Наиболее заразен больной человек в течение двух недель до возникновения желтухи или повышения уровня печеночных ферментов, когда концентрация вируса в стуле максимальная. После появления желтухи концентрация вируса в стуле снижается. Дети и подростки могут выделять вирус в течение более долгого времени (до нескольких месяцев после возникновения симптомов заболевания), чем взрослые. Хроническое выделение вируса гепатита А не встречается, однако такое возможно у пациентов с рецидивом инфекции. Виремия наблюдается вскоре после заражения и сохраняется вплоть до повышения уровня печеночных ферментов.

Дифференциальная диагностика с другими видами вирусных гепатитов на основе клинической картины или эпидемиологического анамнеза невозможна. Поэтому определение иммуноглобулинов М к капсидному белку ВГА необходимо для подтверждения диагноза «острая ВГА-инфекция». У большинства пациентов анти-ВГА IgM можно определить за 5-10 дней до появления симптомов, и они могут сохраняться в крови в течение 6 месяцев. Анти-ВГА IgG появляются в крови после проявления клинической картины и остаются в течение всей жизни человека, формируя пожизненный иммунитет против ВГА. Коммерческие тест-системы в основном направлены на выявление IgM и суммарных антител (IgM и IgG) против вируса гепатита А в сыворотке крови человека.

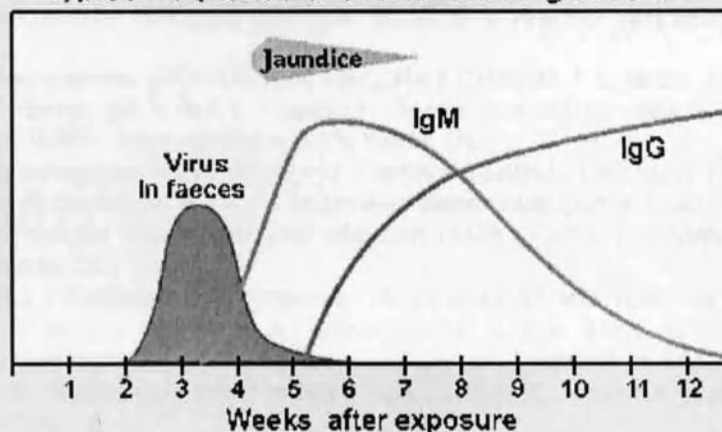
РНК ВГА может быть определена с помощью ПЦР в крови и кале у пациентов во время острой фазы. Определение последовательности РНК позволяет отнести вирус к тому или иному изоляту.

ВГА передается фекально-оральным путем, через зараженную пищу и воду. В редких случаях, возможно заражение трансмиссивным путем при переливании крови или ее продуктов, полученных от донора с ВГА вирусемией. У зараженных лабораторных животных (приматов) ВГА определялся в слюне во время инкубационного периода, однако возможность передачи инфекции через слюну показана не была.

В зависимости от условий, ВГА может быть стабилен в окружающей среде в течение нескольких месяцев. Прогрев пищи при температуре 85°C в течение 1 минуты и обработка поверхности 1:100 разведением гипохлорита натрия в водопроводной воде необходимы для инактивации ВГА.

Так как для большинства детей характерно бессимптомное течение инфекции, они играют важную роль в распространении инфекции. В одном из исследований, у 52 % взрослых без идентифицированного источника заражения имелись дети младше 6 лет, поэтому наличие в доме детей младшего возраста было связано с распространением ВГА инфекции. При серологическом тестировании детей, бывших в контакте с взрослыми, инфицированными ВГА, было показано, что 25-40% из них имели IgM к вирусу гепатита А.

Hepatitis A typical sequence of events following infection



Тест-система HAV IgM предназначена для качественного определения иммуноглобулинов класса М против ВГА в сыворотке и плазме крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе реагентов реализован двустадийный «capture»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Если в образце присутствуют иммуноглобулины класса М, то во время первой инкубации они связываются с антителами, специфичными к IgM человека, которые иммобилизованы на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок). Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Если среди связавшихся IgM присутствуют антитела к соответствующему возбудителю, то во время следующей стадии анализа они связываются с комплексом специфический антиген-антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству специфических IgM в анализируемых пробах. Наличие IgM оценивают относительно значения cut-off.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

РЕАГЕНТЫ - KIT REAGENTS

Реагент	Количество	Состояние
MICROPLATE Микропланшет	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
CONTROL - Отрицательный контроль	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CONTROL + Положительный контроль	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CAL Калибровочная проба	2 флакона	Лиофилизированный препарат
WASHBUF 20X 20x Промывочный буфер	1 x 50 мл	Концентрированный раствор Conc.
CONJ 20X Конъюгат	1 x 0,8 мл	Концентрированный раствор Conc.
Ag HAV Антиген ВГА	1 x 16 мл	Готов к использованию Ready for use
DILSPE Раствор для разведения образцов	2 x 50 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MICROPLATE) / Microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок). Лунки стрипов планшета покрыты антителами к IgM человека. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).
 - **Отрицательный контроль (CONTROL -) / Negative Control:** 1 флакон. Бесцветный раствор на основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,0±0,1, содержит белки сыворотки козы и 0,1% Твин 20. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.
 - **Положительный контроль (CONTROL +) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор зеленого цвета на основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,0±0,1, содержит белки сыворотки козы, 0,1% Твин 20 и IgM к вирусу гепатита А в концентрации выше чем 100 мМЕ/мл (ВОЗ). Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.
 - **Калибратор (CAL) / Calibrator:** 2 флакона. На основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,0±0,1, содержит 2% БСА и IgM к вирусу гепатита А. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC. Лиофилизирован. Перед использованием растворите содержимое флакона в объеме дистиллированной воды, который указан на этикетке. Восстановленный реагент хранить при -20°C. Повторное замораживание не допускается.
- Внимание:** Объем, необходимый для растворения содержимого флакона, может быть различным для разных партий реагента. Обратите внимание, чтобы препарат был растворен именно в том объеме воды, который указан на этикетке флакона.
- **Промывочный раствор 20x (WASHBUF 20X) / Washing buffer concentrate:** 1 флакон. 1x Промывочный раствор представляет собой 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7,0±0,2, содержащий 0,05% Твин 20 и 0,05% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 7 суток при +2...8°C.
 - **Конъюгат 20x (CONJ) / Enzyme Conjugate 20x:** 1 флакон. Раствор на основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,8±0,1, содержит антитела к вирусу гепатита А, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), 2% БСА, 0,02% гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. За 5-10 минут перед использованием развести необходимое количество концентрата конъюгата антигеном ВГА в соотношении 1:20.
 - **Антиген ВГА (Ag HAV) / HAV Antigen:** 1 флакон. Раствор красного цвета на основе трисового буфера, pH 6,8±0,1, содержащий 2% БСА и инактивированный вирус гепатита А. Консерванты: 0,02% гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.
 - **Раствор для разведения образцов (DILSPE) / Specimen Diluent:** 2 флакона. Раствор голубого цвета на основе трисового буфера, pH 6,0±0,1, содержащий белки сыворотки козы и 0,1% Твин 20. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.
 - **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
 - **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.
 - **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
 - **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определялась на панели образцов, полученных от доноров и пациентов, не имеющих иммунитета к ВГА, которые были определены как отрицательные референтной тест-системой.

Не было обнаружено ложноположительных реакций при тестировании анализируемых образцов разных типов.

Не было также обнаружено влияния на специфичность заморозки анализируемых образцов.

Были протестированы образцы пациентов с другими вирусными заболеваниями (ВГС, ВГД, ВГВ, ВИЧ) и с гепатитами невирусной природы. Ложноположительных реакций обнаружено не было.

В общей сложности в независимых референсных лабораториях было протестировано более 500 образцов. Диагностическая специфичность составила > 98%.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность исследовалась на панели образцов, которые были определены как положительные одобренной FDA тест-системой. Образцы были получены от пациентов с острой ВГА-инфекцией, подтвержденной клинической картиной и данными лабораторных исследований.

В общей сложности было протестировано более 100 образцов. Диагностическая чувствительность составила 100%.

Дополнительно была протестирована сероконверсионная панель (ВВІ, США). Результаты, полученные при тестировании, представлены в нижеследующей таблице.

Сероконверсионная панель: PNT 902

Образец	ОП, 450 нм	S/CO	DiaSorin	
			S/CO	Диагноз
Отрицательный контроль	0,048	0,2		
Положительный контроль	1,736	5,8		
PNT 902				
1	0,037	0,1	0,3	отрицательный
2	0,042	0,1	0,3	отрицательный
3	1,956	6,6	6,8	положительный
4	1,988	6,7	6,7	положительный
5	0,669	2,2	1,5	положительный

3.3 Прецизионность

Два образца (один отрицательный и один слабopоложительный) анализировались в трех независимых постановках. В каждой из постановок образцы были нанесены в 16 репликатах. Результаты, полученные при изучении прецизионности, представлены в нижеследующих таблицах.

Постановка 1

Образец	Отрицательный	Слабopоложительный
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,058	0,719
Ст. откл.	0,008	0,052
КВ, %	14,3	7,2

Постановка 2

Образец	Отрицательный	Слабopоложительный
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,048	0,709
Ст. откл.	0,007	0,063
КВ, %	13,9	8,9

Постановка 3

Образец	Отрицательный	Слабopоложительный
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,050	0,713
Ст. откл.	0,007	0,055
КВ, %	13,4	7,7

Изменения диагнозов образцов обнаружено не было.

3.4 Предел детекции

Так как международные стандарты для анти-ВГА IgM отсутствуют, этот параметр был определен с помощью контрольных образцов, полученные из Boston Biomedica Inc., США (Accurun №51 и Accurun №121). Оба контрольных образца были разведены Раствором для разведения образцов в 100 раз, для Accurun 121 были дополнительно приготовлены другие разведения. Результаты определения предела детекции представлены в нижеследующей таблице.

Контрольный образец	Разведение	S/CO
Accurun №121	1:100	5,4
	1:200	4,1
	1:400	2,8
	1:800	1,9
	1:1600	1,0
Accurun №51	1:100	4,2

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты (см.2.2.1.) разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.

- Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирачный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

– При заборе венозной крови следует соблюдать правила асептики. Сыворотку или плазму крови получают по общепринятой методике подготовки образцов для лабораторного анализа. Не было обнаружено существенного влияния цитрата, солей ЭДТА и гепарина на результаты анализа.

– Образцы должны быть четко маркированы во избежание ошибочной интерпретации результатов. Настоятельно рекомендуется применять штрих-кодирование и электронный датчик для считывания штрих-кода, в особенности, если набор применяется для скрининга донорской крови.

– Не допускается применять образцы с видимыми признаками гемолиза (красный цвет) и липемии («молочный» оттенок), так как при этом может быть получен ложный результат. По этой же причине не допускается применять образцы, содержащие фибрин, твердые частицы или видимые признаки микробной контаминации.

– Сыворотку и плазму допускается хранить при температуре $+2^{\circ}\text{C}$.. $+8^{\circ}\text{C}$ в течение 5 суток после сбора. При необходимости более длительного хранения образцы допускается хранить при температуре -20°C в течение нескольких месяцев. Не допускается повторное замораживание/размораживание образцов, так как образовавшиеся при этом включения могут влиять на результат анализа.

– При обнаружении твердых частиц, образцы перед проведением анализа центрифугируют в течение 20 минут при 2000 об/мин, либо очищают фильтрованием (диаметр пор фильтра 0,2-0,8 мкм).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18^{\circ}\text{C}$.. $+25^{\circ}\text{C}$).

– Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Разведите анализируемые образцы 1:101 (например, 1000 мкл Раствора для разведения образцов + 10 мкл образца).

7.2. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank), 3 лунки для отрицательного контроля, 2 лунки для калибратора и одну лунку для положительного контроля.

7.3. Внесите по 100 мкл контролей в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.4. Внесите по 100 мкл разведенных анализируемых образцов.

Примечание: Убедитесь, что образцы и контроли были действительно добавлены в лунки.

7.5. Инкубируйте планшет в течение 60 минут при $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Примечание: Стрипы следует заклеивать специальной пленкой, входящей в состав набора, только в том случае, если анализ проводится вручную. При автоматической постановке анализа клейкая пленка не требуется.

7.6. За 5-10 минут до окончания первой инкубации приготовьте иммунокомплекс (Антиген ВГА-Антитела, конъюгированные с пероксидазой). Для этого разведите необходимое количество концентрата конъюгата антигеном ВГА в соотношении 1:20.

7.7. Удалите содержимое лунок и с помощью автоматического промывочного устройства промойте микропланшет 4–5 раз подготовленным к работе Промывочным раствором. При каждой промывке добавляйте по 350 мкл Промывочного раствора в каждую лунку.

7.8. Внесите во все лунки, кроме лунки А1, по 100 мкл иммунокомплекса. Убедитесь, что окрашенный раствор внесен во все необходимые лунки. Заклейте планшет клейкой пленкой.

Примечание: Во время внесения Конъюгата избегайте прикасаться наконечником пипетки к внутренней стороне лунок во избежание контаминации.

7.9. Инкубируйте микропланшет в течение 60 минут при $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.

7.10. Удалите содержимое лунок и промойте лунки, как описано в п. 7.7.

7.11. Внесите по 100 мкл Раствора ТМБ в каждую лунку, включая А1. Инкубируйте планшет при комнатной температуре в течение 20 минут.

Примечание: Во избежание высокого фонового сигнала, не допускайте попадания света на планшет.

7.12. Остановите ферментативную реакцию добавлением 100 мкл Стоп-реагента в каждую лунку. Стоп-реагент следует вносить в лунки в той же последовательности, как и Раствор ТМБ. После внесения Стоп-реагента окраска Положительного контроля и положительных образцов изменится с голубой на желтую.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 9.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов

Определить среднюю оптическую плотность (ОП) Отрицательного контроля (ОК). Рассчитать значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = \text{ОП}_{\text{срОК}} + 0,250$$

Примечание: Если расчет результатов проводится операционной системой автоматического анализатора, следует убедиться, что задана правильная формула для вычисления значения cut-off и последующего расчета результатов.

Присутствие или отсутствие IgM против ВГА определяется путем деления ОП образца на значение Cut-off.

Образцы, для которых при делении на Cut-off, получено значение менее 0,8 признают нереактивными (не содержащими IgM против ВГА).

Образцы, для которых при делении на Cut-off, получено значение более 1,2, признают реактивными (содержащими IgM против ВГА). Пациент должен получить соответствующую медицинскую помощь.

Область 0,8 – 1,2 является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным. Следует повторить анализ через 1-2 недели, получив для этого свежий образец сыворотки или плазмы.

Примечания:

- Во избежание ошибок, интерпретацию результатов следует проводить под наблюдением руководителя лаборатории.
- Любой положительный результат анализа должен быть подтвержден альтернативным методом, прежде чем будет установлен диагноз «вирусный гепатит».
- При сообщении результатов из лаборатории в другие подразделения следует предпринимать меры для исключения ошибок при передаче данных.
- Устанавливать диагноз «вирусный гепатит» и доводить его до сведения пациента должен персонал, имеющий высшее медицинское образование и соответствующую специальную квалификацию.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных данных.

ОП репликатов Отрицательного контроля (ед.опт.плот.): 0,050 – 0,060 – 0,070

Среднее значение: 0,060

Критерий достоверности (< 0,150) Выполняется

ОП Положительного контроля (ед.опт.плот.): 2,189

Критерий достоверности (> 0,500) Выполняется

$$\text{Cut-Off} = 0,060 + 0,250 = 0,310$$

ОП репликатов Калибратора (ед.опт.плот.): 0,550 – 0,530

Среднее значение: 0,540

$$\text{Отношение ОП/Cut-off} = 1,7$$

Критерий достоверности (отношение > 1,0) Выполняется

ОП Образца 1 (ед.опт.плот.): 0,070

ОП Образца 2 (ед.опт.плот.): 1,690

Для Образца 1 ОП/Cut-off < 0,8 Образец считается отрицательным

Для Образца 2 ОП/Cut-off > 1,2 Образец считается положительным

9.2. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям.

Описание	Условие
Blank	< 0,050
Отрицательный контроль ОП Калибратора/Cut-off	< 0,150; КВ < 30% > 1,0
Положительный контроль	> 0,500

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

При несоответствии критериям следует немедленно известить руководство лаборатории. Некоторые возможные причины несоответствия приведены ниже. Перед повторным проведением анализа следует убедиться, что эти причины устранены.

Описание дефекта	Возможная причина
ОП в лунке для обнуления > 0,050	Раствор ТМБ был загрязнен в процессе анализа.
ОП Отрицательного контроля > 0,150, КВ > 30%	1. Не были предварительно подобраны оптимальные параметры промывки и/или настройки промывочного устройства; 2. Использован неподходящий промывочный буфер либо магистрали промывочного устройства не были промыты соответствующим буфером перед началом работы; 3. Ошибка оператора в процессе внесения контролей (положительный контроль вместо отрицательного); 4. Контаминация флакона с Отрицательным контролем, либо лунок, в которые он был внесен, следами положительных образцов или Конъюгата; 5. Загрязнение пипеток следами положительных образцов или Конъюгата; 6. Закупоренные или засоренные иглы автоматического промывочного устройства.
Калибровочная проба: отношение ОП/ Cut-off < 1,0	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Калибровочной пробы (например, вместо нее внесен Отрицательный контроль); 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Калибровочной пробы
ОП положительного контроля < 0,500	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Положительного контроля; 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Положительного контроля.

9.3. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию IgM против ВГА.
- Реактивные и сомнительные образцы признают положительными по содержанию IgM против ВГА.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 3 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Получение ложноположительных результатов возможно в менее 2% случаев и связано с высокой концентрацией ревматоидного фактора.

Замороженные образцы, содержащие фибрин, после разморозки могут давать ложные результаты.

Бактериальная контаминация и термоинактивация могут сказаться на оптической плотности образцов, что приведет к неправильному определению уровня анализата.

Тест-система предназначена только для исследования индивидуальных образцов, не следует использовать в качестве анализируемого образца пулы.

Постановка диагноза не должна основываться на единичном лабораторном исследовании, следует принимать во внимание анамнез и результаты исследования другими методами.

СХЕМА АНАЛИЗА

Реагенты \ Лунки	Blank	CONTROL -	CAL	CONTROL +	Образцы (разведенные в 101 раз)
CONTROL -	-----	100 мкл	-----	-----	-----
CAL	-----	-----	100 мкл	-----	-----
CONTROL +	-----	-----	-----	100 мкл	-----
Образцы (разведенные в 101 раз)	-----	-----	-----	-----	100 мкл

Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 60 мин.

* Промывка: 4-5 x 350 мкл.

Иммунокомплекс	-----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------	-------	---------	---------	---------	---------

* Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 60 мин.

* Промывка: 4-5 x 350 мкл

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------	---------

* Инкубация: комнатная температура, 20 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм).

Примерная схема нанесения образцов на микропланшет:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	ОБ2										
B	K(-)	ОБ3										
C	K(-)	ОБ4										
D	K(-)	ОБ5										
E	КП	ОБ6										
F	КП	ОБ7										
G	K(+)	ОБ8										
H	ОБ1	ОБ9										

Условные обозначения:

BLK = лунка для обнуления (Blank)

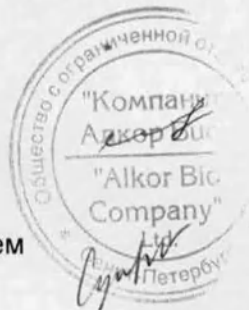
K(-) = отрицательный контроль

K(+) = положительный контроль

ОБ - образцы

Генеральный директор
ОО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ОО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 10 (десять) лист

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА Е В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА HEV Ab

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Вирус гепатита Е (ВГЕ) - недавно открытый вирус с фекально-оральным путем передачи. ВГЕ не имеет оболочки и содержит одноцепочечную РНК. По строению он похож на калицивирусы и был найден в фекалиях больного. ВГЕ - это серьезная проблема во многих развивающихся странах. Первая вспышка гепатита Е была зарегистрирована в 1955 году в Нью Дели, Индия. Это заболевание никогда не переходит в хроническую форму, однако характеризуется большой частотой неблагоприятных исходов у беременных женщин.

Изучение генома ВГЕ позволило разработать тест-системы для определения анти-ВГЕ антител. Они основаны на синтетических антигенах из иммунодоминантных консервативных регионов ВГЕ.

Тест-система HEV Ab предназначена для качественного определения иммуноглобулинов против ВГЕ в сыворотке и плазме крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип действия данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела против ВГЕ (если они есть в образце) связываются с синтетическими антигенами из иммунодоминантных консервативных регионов мексиканской и бирманской линий вируса, адсорбированными на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение следующей инкубации поликлональные антитела против IgG и IgM человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом антиген ВГЕ – антитело. После цикла промывок в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание специфических антител в образцах и контролях прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
MICROPLATE Микропланшет	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
CONTROL - Отрицательный контроль	2 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CONTROL + Положительный контроль	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CAL Калибровочная проба	2 флакона	Лиофилизированный препарат
WASHBUF 20X 20x Промывочный буфер	1 x 50 мл	Концентрированный раствор Conc.
CONJ Конъюгат	1 x 16 мл	Готов к использованию Ready for use
DILAS	1 x 8,0 мл	Готов к использованию

Аналитический буфер		Ready for use
DILSPE Раствор для разведения образцов	1 x 50 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MICROPLATE) / Microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок). Лунки стрипов планшета покрыты синтетическими антигенами ВГЕ из регионов ORF2 и ORF3. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

- **Отрицательный контроль (CONTROL -) / Negative Control:** 2 флакона. Раствор оливково-зеленого цвета на основе 10 мМ Na-цитратного буфера, pH 6,0±0,1, содержит 1% белков сыворотки козы и 0,5% Твин 20. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.

- **Положительный контроль (CONTROL +) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор темно-зеленого цвета на основе 10 мМ Na-цитратного буфера, pH 6,0±0,1, содержит 1% белков сыворотки козы, 0,5% Твин 20 и антитела человека к ВГЕ. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.

- **Калибратор (CAL) / Calibrator:** 2 флакона. На основе Na-цитратного буфера, pH 6,0±0,1, содержит фетальную бычью сыворотку и антитела человека к ВГЕ в концентрации 4±10% МЕ/мл (относительно Первого Международного стандарта для антител к ВГЕ, NIBSC, 95/584). Консерванты: 0,3 мг/мл гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Лиофилизирован. Перед использованием растворите содержимое флакона в объеме дистиллированной воды, указанном на этикетке флакона. Восстановленный реагент хранить при -20°C. Повторное замораживание не допускается.

- **Промывочный раствор 20x (WASHBUF 20X) / Washing buffer concentrate:** 1 флакон. 1x Промывочный раствор представляет собой 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7,0±0,2, содержащий 0,05% Твин 20 и 0,1% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 7 суток при +2...8°C.

- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон. Раствор красного цвета на основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,8±0,1, содержит козы поликлональные антитела к IgG и IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), 5% BCA, 0,02% гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.

- **Аналитический буфер (DILAS) / Assay Diluent:** 1 флакон. Раствор на основе 10 мМ трисового буфера, pH 8,0±0,1, содержащий 0,1% Катон GC. Для предварительной обработки образцов и контролей на плате для блокирования интерференции.

- **Раствор для разведения образцов (DILSPE) / Specimen Diluent:** 1 флакон. Раствор оливково-зеленого цвета на основе 10 мМ Na-цитратного буфера, pH 6,0±0,1, содержит 0,5% Твин 20. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.

Внимание: При добавлении образца раствор меняет цвет с оливково-зеленого на темный сине-зеленый.

- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.

- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.

- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**

- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определялась как способность метода определять образцы, не содержащие специфический аналит, как отрицательные. Было протестировано более 500 доноров и пациентов, не имеющих иммунитета к ВГЕ. Диагностическая специфичность относительно FDA-одобренной тест-системы - составляет > 99,5%.

Было протестировано более 100 образцов с потенциальной интерференцией (пациенты с другими инфекционными заболеваниями, с гепатитами невирусной природы, пациенты после диализа, беременные женщины, гемолизированные образцы и образцы с липидемией и т.д.). Специфичность составила 100%.

Не было обнаружено ложноположительных реакций при тестировании анализируемых образцов разных типов.

Не было также обнаружено влияния на специфичность заморозки анализируемых образцов.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определялась как способность метода определять образцы, содержащие специфический аналит, как положительные. Исследования проводились как на базе RADIM, так и на базе других лабораторий. Было протестировано в общей сложности 200 образцов от пациентов, имеющих иммунитет к ВГЕ. Диагностическая чувствительность составила 100%.

3.3 Прецизионность

Два образца (один отрицательный и один слабоположительный) анализировались в трех независимых постановках. В каждой из постановок образцы были нанесены в 16 репликатах.

Полученные значения КВ попадают в диапазон 5-10% и зависят от величины оптической плотности при 450 нм. Изменения диагнозов образцов обнаружено не было.

3.4 Предел детекции

Этот параметр был определен с помощью Первого Международного Стандарта антител к ВГЕ (NIBSC, 95/584). Предел детекции составляет 2 МЕ/мл.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты разных серий набора (см.п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
 - Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
 - Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
 - Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
 - Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
 - Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
 - Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
 - Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
 - Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
 - В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
 - Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
 - Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
 - Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
 - Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
 - Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.
- Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:**
- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
 - Не разрешается пипетировать ртом.
 - Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
 - Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HsAg , антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Используемый при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

- При заборе венозной крови следует соблюдать правила асептики. Сыворотку или плазму крови получают по общепринятой методике подготовки образцов для лабораторного анализа. Не было обнаружено существенного влияния цитрата, солей ЭДТА и гепарина на результаты анализа.
- Не допускается добавление в анализируемые образцы консервантов, особенно азиды натрия, так как они могут повлиять на ферментативную активность конъюгата и способствовать возникновению ложноотрицательных результатов.
- Образцы должны быть четко маркированы во избежание ошибочной интерпретации результатов. Настоятельно рекомендуется применять штрих-кодирование и электронный датчик для считывания штрих-кода, в особенности если набор применяется для скрининга донорской крови.
- Не допускается применять образцы с видимыми признаками гемолиза (красный цвет) и липемии («молочный» оттенок), так как при этом может быть получен ложный результат. По этой же причине не допускается применять образцы, содержащие фибрин, твердые частицы или видимые признаки микробной контаминации.
- Сыворотку и плазму допускается хранить при температуре $+2^\circ\text{C} \dots +8^\circ\text{C}$ в течение 5 суток после сбора. При необходимости более длительного хранения образцы допускается хранить при температуре -20°C в течение нескольких месяцев. Не допускается повторное замораживание/размораживание образцов, так как образовавшиеся при этом включения могут влиять на результат анализа.
- При обнаружении твердых частиц, образцы перед проведением анализа центрифугируют в течение 20 минут при 2000 об/мин, либо очищают фильтрованием (диаметр пор фильтра 0,2-0,8 мкм).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18 \dots +25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank), 3 лунки для Отрицательного контроля, 2 лунки для калибратора и одну лунку для Положительного контроля.

7.2. Внесите по 200 мкл контролей в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Добавьте **по 200 мкл** раствора для разведения образцов во все лунки для образцов и внесите **по 10 мкл** анализируемых образцов. Осторожно перемешайте, избегая расплескивания во избежание контаминации соседних лунок.

Примечание: Убедитесь, что образцы были действительно добавлены в лунки. Это можно установить по изменению окраски раствора с оливково-зеленой на темную сине-зеленую.

7.4. Внесите во все лунки с образцами, Контролями и Калибратором **по 50 мкл** Аналитического буфера. Убедитесь, что окраска раствора изменилась на синюю.

7.5. Инкубируйте планшет **в течение 45 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$** .

Примечание: Стрипы следует заклеивать специальной пленкой, входящей в состав набора, только в том случае, если анализ проводится вручную. При автоматической постановке анализа клейкая пленка не требуется.

7.6. Удалите содержимое лунок и с помощью автоматического промывочного устройства промойте микропланшет **4–5 раз** подготовленным к работе Промывочным раствором. При каждой промывке добавляйте **по 300 мкл** Промывочного раствора в каждую лунку.

7.7. Внесите во все лунки, кроме лунки A1, **по 100 мкл** Конъюгата. Убедитесь, что окрашенный раствор внесен во все необходимые лунки. Заклейте планшет клейкой пленкой.

Примечание: Во время внесения Конъюгата избегайте прикасаться наконечником пипетки к внутренней стороне лунок во избежание контаминации.

7.8. Инкубируйте микропланшет **в течение 45 минут при $+37 \pm 2^\circ\text{C}$** .

7.9. Удалите содержимое лунок и промойте лунки, как описано в п. 7.6.

7.10. Внесите **по 100 мкл** Раствора ТМБ в каждую лунку, включая A1. Инкубируйте планшет **при комнатной температуре ($+18...25^\circ\text{C}$) в течение 15 минут**.

Примечание: Во избежание высокого фонового сигнала, не допускайте попадания света на планшет.

7.11. Остановите ферментативную реакцию добавлением **100 мкл** Стоп-реагента в каждую лунку. Стоп-реагент следует вносить в лунки в той же последовательности, как и Раствор ТМБ. После внесения Стоп-реагента окраска Положительного контроля и положительных образцов изменится с голубой на желтую.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 7.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. **Анализ результатов** Определите среднюю оптическую плотность (ОП) Отрицательного контроля (ОК). Рассчитайте значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = \text{ОП}_{\text{срОК}} + 0,35 \quad (1)$$

Примечание: Если расчет результатов проводится операционной системой автоматического анализатора, следует убедиться, что задана правильная формула для вычисления значения cut-off и последующего расчета результатов.

Присутствие или отсутствие антител против ВГЕ определяется путем деления ОП образца на значение Cut-off.

Образцы, для которых при делении на Cut-off получено значение менее 0,9, признают нереактивными (не содержащими антитела против ВГЕ).

Образцы, для которых при делении на Cut-off получено значение более 1,1, признают реактивными (содержащими антитела против ВГЕ).

Область 0,9 – 1,1 является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным.

Отрицательный результат означает, что пациент не был инфицирован ВГЕ и что данный препарат донорской крови можно использовать для переливания.

У всех пациентов с сомнительным результатом следует повторить анализ через 1-2 недели, получив для этого свежий образец сыворотки или плазмы. Препарат донорской крови, давший сомнительный результат, не допускается использовать для переливания.

Положительный результат анализа указывает на наличие инфицирования ВГЕ. Пациент должен получить соответствующую медицинскую помощь, а препарат донорской крови должен быть уничтожен.

Примечания:

- Во избежание ошибок, интерпретацию результатов следует проводить под наблюдением руководителя лаборатории.
- Любой положительный результат анализа должен быть подтвержден альтернативным методом (подтверждающим тестом, предназначенным для определения антител класса IgG и IgM), прежде чем будет установлен диагноз «вирусный гепатит».
- Поскольку настоящий анализ способен определять в том числе и антитела класса IgM, его результаты могут в ряде случаев не совпадать с результатами других коммерческих наборов для определения антител к вирусу гепатита E, в состав которых не входит конъюгат антител к IgM человека с пероксидазой. Подобные наборы не позволяют обнаруживать антитела класса IgM, поэтому в таких случаях для правильной диагностики инфекции вирусом гепатита E требуется анализ, подтверждающий наличие IgM.
- При сообщении результатов из лаборатории в другие подразделения следует предпринимать меры для исключения ошибок при передаче данных.
- Устанавливать диагноз «вирусный гепатит» и доводить его до сведения пациента должен персонал, имеющий высшее медицинское образование и соответствующую специальную квалификацию.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных.

ОП репликатов Отрицательного контроля (ед.опт.плотн.): 0,019 ; 0,020 ; 0,021

Среднее значение ОП ОК (ед.опт.плотн.): 0,020

Критерий достоверности ($< 0,050$) Выполняется

ОП Положительного контроля (ед.опт.плотн.): 2,189

Критерий достоверности ($> 1,000$) Выполняется

Cut-Off = $0,020 + 0,350 = 0,370$

ОП репликатов Калибратора (ед.опт.плотн.): 0,550 ; 0,530

Среднее значение (ед.опт.плотн.): 0,540

Отношение ОП/Cut-off = 1,4

Критерий достоверности (отношение $> 1,0$) Выполняется

ОП Образца 1 (ед.опт.плотн.): 0,070

ОП Образца 2 (ед.опт.плотн.): 1,690

Для Образца 1 ОП/Cut-off $< 0,9$ - Образец считается отрицательным

Для Образца 2 ОП/Cut-off $> 1,1$ - Образец считается положительным

9.2. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

Описание	Условие
Blank	$< 0,100$
Отрицательный контроль	$< 0,050$
ОП Калибратора/Cut-off	$> 1,0$
Положительный контроль	$> 1,000$

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

При несоответствии критериям следует немедленно известить руководство лаборатории. Некоторые возможные причины несоответствия приведены ниже. Перед повторным проведением анализа следует убедиться, что эти причины устранены.

Описание дефекта	Возможная причина
ОП в лунке для обнуления >0,100	Раствор ТМБ был загрязнен в процессе анализа.
ОП Отрицательного контроля > 0,050	1. Не были предварительно подобраны оптимальные параметры промывки и/или настройки промывочного устройства; 2. Использован неподходящий промывочный буфер либо магистрали промывочного устройства не были промыты соответствующим буфером перед началом работы; 3. Ошибка оператора в процессе внесения контролей (положительный контроль вместо отрицательного); 4. Контаминация флакона с Отрицательным контролем, либо лунок, в которые он был внесен, следами положительных образцов или Конъюгата; 5. Загрязнение пипеток следами положительных образцов или Конъюгата; 6. Закупоренные или засоренные иглы автоматического промывочного устройства.
Калибровочная проба: отношение ОП/ Cut-off < 1,1	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Калибровочной пробы (например, вместо нее внесен Отрицательный контроль); 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Калибровочной пробы
ОП Положительного контроля < 1,000	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Положительного контроля; 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Положительного контроля.

9.3. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию антител против ВГЕ.
- Реактивные и сомнительные образцы признают положительными по содержанию антител против ВГЕ.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 6 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Повторяющиеся ложноположительные результаты наблюдаются у менее 1% здоровых людей. Замороженные образцы, содержащие фибрин, после разморозки могут давать ложные результаты.

СХЕМА АНАЛИЗА

Реагенты	Лунки	Blank	CONTROL -	CAL	CONTROL +	Образцы
CONTROL -		----	200 мкл	----	----	----
CAL		----	----	200 мкл	----	----
CONTROL +		----	----	----	200 мкл	----
DILSPE		----	----	----	----	200 мкл
Образцы		----	----	----	----	10 мкл
DILAS		----	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл

- Инкубация: 37± 2°C, 45 мин.
- Промывка: 4-5 x 300 мкл.

Конъюгат CONJ	----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
---------------	------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37± 2°C, 45 мин.
- Промывка: 4-5 x 300 мкл

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: комнатная температура, 15 мин.

топ-реагент	STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------	------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм).

Примерная схема нанесения образцов на микропланшет:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	ОБ2										
B	K(-)	ОБ3										
C	K(-)	ОБ4										
D	K(-)	ОБ5										
E	КП	ОБ6										
F	КП	ОБ7										
G	K(+)	ОБ8										
H	ОБ1	ОБ9										

Условные обозначения:

BLK = лунка для обнуления (Blank)

K(-) = отрицательный контроль

КП = калибровочная проба

K(+) = положительный контроль

ОБ - образцы

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем

ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 8 (восемь) листов

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G К ВИРУСУ ГЕПАТИТА Е В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА HEV IgG

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Вирус гепатита Е (ВГЕ) - недавно открытый вирус с фекально-оральным путем передачи. ВГЕ не имеет оболочки и содержит одноцепочечную РНК. По строению он похож на калицивирусы и был найден в фекалиях больного. ВГЕ это серьезная проблема во многих развивающихся странах. Первая вспышка гепатита Е была зарегистрирована в 1955 году в Нью Дели, Индия. Это заболевание никогда не переходит в хроническую форму, однако характеризуется большой частотой неблагоприятных исходов у беременных женщин.

Изучение генома вируса гепатита Е позволило разработать тест-системы для определения анти-ВГЕ антител. Они основаны на синтетических антигенах из иммунодоминантных консервативных регионов вируса гепатита Е.

Тест-система HEV IgG предназначена для качественного определения иммуноглобулинов класса G против ВГЕ в сыворотке и плазме крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип работы данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела против ВГЕ (если они есть в образце) связываются с синтетическими антигенами из иммунодоминантных консервативных регионов мексиканской и бирманской линий вируса, адсорбированными на твердой фазе (в лунках планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение следующей инкубации поликлональные антитела против IgG человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом антиген ВГЕ – антитело. После цикла промывок в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание специфических IgG антител в образцах и контролях прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
MICROPLATE Микропланшет	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
CONTROL - Отрицательный контроль	2 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CONTROL + Положительный контроль	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CAL Калибровочная проба	2 флакона	Лиофилизированный препарат
WASHBUF 20X 20x Промывочный буфер	1 x 50 мл	Концентрированный раствор Conc.
CONJ Конъюгат	1 x 16 мл	Готов к использованию Ready for use

DILAS Аналитический буфер	1 x 8,0 мл	Готов к использованию Ready for use
DILSPE Раствор для разведения образцов	1 x 50 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MICROPLATE) / Microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок). Лунки стрипов планшета покрыты синтетическими антигенами вируса гепатита Е из регионов ORF2 и ORF3. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...+8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).
- **Отрицательный контроль (CONTROL -) / Negative Control:** 2 флакона. Раствор оливково-зеленого цвета на основе 10 мМ Na-цитратного буфера, pH 6,0±0,1, содержит 1% белков сыворотки козы и 0,5% Твин 20. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.
- **Положительный контроль (CONTROL +) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор темно-зеленого цвета на основе 10 мМ Na-цитратного буфера, pH 6,0±0,1, содержит 1% белков сыворотки козы, 0,5% Твин 20 и антитела человека к вирусу гепатита Е. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.
- **Калибратор (CAL) / Calibrator:** 2 флакона. На основе Na-цитратного буфера, pH 6,0±0,1, содержит фетальную бычью сыворотку и антитела человека к вирусу гепатита Е в концентрации 4±10% МЕ/мл (относительно Первого Международного стандарта для антител к ВГЕ, NIBSC, 95/584). Консерванты: 0,3 мг/мл гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Лиофилизирован. Перед использованием растворите содержимое флакона в объеме дистиллированной воды, который указан на этикетке. Восстановленный реагент хранить при -20°C. Повторное замораживание не допускается.
- Внимание:** Объем, необходимый для растворения содержимого флакона, может быть различным для разных партий реагента. Обратите внимание, чтобы препарат был растворен именно в том объеме воды, который указан на этикетке флакона.
- **Промывочный раствор 20x (WASHBUF 20X) / Washing buffer concentrate:** 1 флакон. 1x Промывочный буфер представляет собой 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7,0±0,2, содержащий 0,05% Твин 20 и 0,1% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 7 суток при +2...+8°C.
- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон. Раствор красного цвета на основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,8±0,1, содержит козы поликлональные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), 5% BCA, 0,02% гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.
- **Аналитический буфер (DILAS) / Assay Diluent:** 1 флакон. Раствор на основе 10 мМ трисового буфера, pH 8,0±0,1, содержащий 0,1% Катон GC. Для предварительной обработки образцов и контролей на плате для блокирования интерференции.
- **Раствор для разведения образцов (DILSPE) / Specimen Diluent:** 1 флакон. Раствор оливково-зеленого цвета на основе 10 мМ Na-цитратного буфера, pH 6,0±0,1, содержит 0,5% Твин 20. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.
- Внимание:** При добавлении образца раствор меняет цвет с оливково-зеленого на темный сине-зеленый.
- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - способность метода определять образцы, не содержащие специфический аналит, как отрицательные. Было протестировано более 500 доноров и пациентов, не имеющих иммунитета к ВГЕ. Диагностическая специфичность относительно FDA-одобренной тест-системы составляет > 99,5%.

Было протестировано более 100 образцов с потенциальной интерференцией (пациенты с другими инфекционными заболеваниями, с гепатитами невирусной природы, пациенты после диализа, беременные женщины, гемолизированные образцы и образцы с липидемией и т.д.). Специфичность составила 100%.

Не было обнаружено ложноположительных реакций при тестировании анализируемых образцов разных типов.

Не было также обнаружено влияния на специфичность заморозки анализируемых образцов.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - способность метода определять образцы, содержащие специфический аналит, как положительные. Исследования проводились как на базе RADIM так и на базе других лабораторий, было протестировано в общей сложности 200 образцов от пациентов, имеющих иммунитет к ВГЕ. Диагностическая чувствительность составила 100%.

3.3 Прецизионность

Два образца (один отрицательный и один слабоположительный) анализировались в трех независимых постановках. В каждой из постановок образцы были нанесены в 16 репликатах.

Полученные значения КВ попадали в диапазон 5-10% и зависели от величины оптической плотности при 450 нм. Изменения диагнозов образцов обнаружено не было.

3.4 Предел детекции

Этот параметр был определен с помощью Первого Международного Стандарта антител к ВГЕ (NIBSC, 95/584). Предел детекции составляет 2 МЕ/мл.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты (см.2.2.1.) разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.

- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Используемый при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC. В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

- При заборе венозной крови следует соблюдать правила асептики. Сыворотку или плазму крови получают по общепринятой методике подготовки образцов для лабораторного анализа. Не было обнаружено существенного влияния цитрата, солей ЭДТА и гепарина на результаты анализа.

- Не допускается добавление в анализируемые образцы консервантов, особенно азиды натрия, так как они могут повлиять на ферментативную активность конъюгата и способствовать возникновению ложноотрицательных результатов.

- Образцы должны быть четко маркированы во избежание ошибочной интерпретации результатов. Настоятельно рекомендуется применять штрих-кодирование и электронный датчик для считывания штрих-кода, в особенности если набор применяется для скрининга донорской крови.

- Не допускается применять образцы с видимыми признаками гемолиза (красный цвет) и липемии («молочный» оттенок), так как при этом может быть получен ложный результат. По этой же причине не допускается применять образцы, содержащие фибрин, твердые частицы или видимые признаки микробной контаминации.

- Сыворотку и плазму допускается хранить при температуре $+2^\circ\text{C} \dots +8^\circ\text{C}$ в течение 5 суток после сбора. При необходимости более длительного хранения образцы допускается хранить при температуре -20°C в течение нескольких месяцев. Не допускается повторное замораживание/размораживание образцов, так как образовавшиеся при этом включения могут влиять на результат анализа.

- При обнаружении твердых частиц, образцы перед проведением анализа центрифугируют в течение 20 минут при 2000 об/мин, либо очищают фильтрованием (диаметр пор фильтра 0,2-0,8 мкм).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18 \dots +25^\circ\text{C}$).
- Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank), 3 лунки для отрицательного контроля, 2 лунки для калибратора и одну лунку для положительного контроля.

7.2. Внесите по 200 мкл контролей в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Добавьте по 200 мкл раствора для разведения образцов во все лунки для образцов и внесите по 10 мкл анализируемых образцов. Осторожно перемешайте, избегая распыливания во избежание контаминации соседних лунок.

Примечание: Убедитесь, что образцы были действительно добавлены в лунки. Это можно установить по изменению окраски раствора с оливково-зеленой на темную сине-зеленую.

7.4. Внесите во все лунки с образцами, Контролями и Калибратором по 50 мкл Аналитического буфера. Убедитесь, что окраска раствора изменилась на синюю.

7.5. Инкубируйте планшет в течение 45 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

Примечание: Стрипы следует заклеивать специальной пленкой, входящей в состав набора, только в том случае, если анализ проводится вручную. При автоматической постановке анализа клейкая пленка не требуется.

7.6. Удалите содержимое лунок и с помощью автоматического промывочного устройства промойте микропланшет 4–5 раз подготовленным к работе Промывочным раствором. При каждой промывке добавляйте по 300 мкл Промывочного раствора в каждую лунку.

7.7. Внесите во все лунки, кроме лунки A1, по 100 мкл Конъюгата. Убедитесь, что окрашенный раствор внесен во все необходимые лунки. Заклейте планшет клейкой пленкой.

Примечание: Во время внесения Конъюгата избегайте прикасаться наконечником пипетки к внутренней стороне лунок во избежание контаминации.

7.8. Инкубируйте микропланшет в течение 45 минут при $+37 \pm 2^\circ\text{C}$.

7.9. Удалите содержимое лунок и промойте лунки, как описано в п. 7.6.

7.10. Внесите по 100 мкл Раствора ТМБ в каждую лунку, включая A1. Инкубируйте планшет при комнатной температуре ($+18...24^\circ\text{C}$) в течение 15 минут.

Примечание: Во избежание высокого фонового сигнала, не допускайте попадания света на планшет.

7.11. Остановите ферментативную реакцию добавлением 100 мкл Стоп-реагента в каждую лунку. Стоп-реагент следует вносить в лунки в той же последовательности, как и Раствор ТМБ. После внесения Стоп-реагента окраска Положительного контроля и положительных образцов изменится с голубой на желтую.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 7.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов

Определить среднюю оптическую плотность (ОП) Отрицательного контроля (ОК). Рассчитать значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = \text{ОП}_{\text{срОК}} + 0,35$$

Примечание: Если расчет результатов проводится операционной системой автоматического анализатора, следует убедиться, что задана правильная формула для вычисления значения Cut-off и последующего расчета результатов.

Присутствие или отсутствие IgG против ВГЕ определяется путем деления ОП образца на значение Cut-off.

Образцы, для которых при делении на Cut-off получено значение менее 0.9 - признают нереактивными (не содержащими IgG против ВГЕ).

Образцы, для которых при делении на Cut-off получено значение более 1,1 - признают реактивными (содержащими IgG против ВГЕ).

Область 0,9 – 1,1 - является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным.

Отрицательный результат означает, что пациент не был инфицирован вирусом гепатита Е и что данный препарат донорской крови можно использовать для переливания.

У всех пациентов с сомнительным результатом следует повторить анализ через 1-2 недели, получив для этого свежий образец сыворотки или плазмы. Препарат донорской крови, давший сомнительный результат, не допускается использовать для переливания.

Положительный результат анализа указывает на наличие инфекции вирусом гепатита Е. Пациент должен получить соответствующую медицинскую помощь, а препарат донорской крови должен быть уничтожен.

Примечания:

- Во избежание ошибок, интерпретацию результатов следует проводить под наблюдением руководителя лаборатории.
- Любой положительный результат анализа должен быть подтвержден альтернативным методом (подтверждающим тестом, предназначенным для определения антител класса IgG), прежде чем будет установлен диагноз «вирусный гепатит».
- При сообщении результатов из лаборатории в другие подразделения следует предпринимать меры для исключения ошибок при передаче данных.
- Устанавливать диагноз «вирусный гепатит» и доводить его до сведения пациента должен персонал, имеющий высшее медицинское образование и соответствующую специальную квалификацию.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных.

ОП репликатов Отрицательного контроля (ед.опт.плот.): 0,019 – 0,020 – 0,021

Среднее значение: 0,020

Критерий достоверности (< 0,050) Выполняется

ОП Положительного контроля (ед.опт.плот.): 2,189

Критерий достоверности (> 1,000) Выполняется

Cut-Off = 0,020 + 0,350 = 0,370

ОП репликатов Калибратора (ед.опт.плот.): 0,550 – 0,530

Среднее значение: 0,540

Отношение ОП/Cut-off = 1,4

Критерий достоверности (отношение > 1,0) Выполняется

ОП Образца 1 (ед.опт.плот.): 0,070

ОП Образца 2 (ед.опт.плот.): 1,690

Для Образца 1 ОП/Cut-off < 0,9 Образец считается отрицательным

Для Образца 2 ОП/Cut-off > 1,1 Образец считается положительным

9.2. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям.

Описание	Условие
Blank	< 0,100
Отрицательный контроль	< 0,050
ОП Калибратора/Cut-off	> 1,0
Положительный контроль	> 1,000

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

При несоответствии критериям следует немедленно известить руководство лаборатории. Некоторые возможные причины несоответствия приведены ниже. Перед повторным проведением анализа следует убедиться, что эти причины устранены.

Описание дефекта	Возможная причина
ОП в лунке для обнуления >0,100	Раствор ТМБ был загрязнен в процессе анализа.
ОП Отрицательного контроля > 0,050	1. Не были предварительно подобраны оптимальные параметры промывки и/или настройки промывочного устройства; 2. Использован неподходящий промывочный буфер либо магистрали промывочного устройства не были промыты соответствующим буфером перед началом работы; 3. Ошибка оператора в процессе внесения контролей (положительный контроль вместо отрицательного); 4. Контаминация флакона с Отрицательным контролем, либо лунок, в которые он был внесен, следами положительных образцов или Конъюгата; 5. Загрязнение пипеток следами положительных образцов или Конъюгата; 6. Закупоренные или засоренные иглы автоматического промывочного устройства.
Калибровочная проба: отношение ОП/ Cut-off < 1,1	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Калибровочной пробы (например, вместо нее внесен Отрицательный контроль); 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Калибровочной пробы
ОП положительного контроля < 1,000	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Положительного контроля; 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Положительного контроля.

9.3. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию IgG против ВГЕ.
- Реактивные и сомнительные образцы признают положительными по содержанию IgG против ВГЕ.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 6 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Повторяющиеся ложноположительные результаты наблюдаются у менее 1% здоровых людей. Замороженные образцы, содержащие фибрин, после разморозки могут давать ложные результаты.

СХЕМА АНАЛИЗА

Реагенты	Лунки	Blank	CONTROL -	CAL	CONTROL +	Образцы
CONTROL -		-----	200 мкл	-----	-----	-----
CAL		-----	-----	200 мкл	-----	-----
CONTROL +		-----	-----	-----	200 мкл	-----
DILSPE		-----	-----	-----	-----	200 мкл
Образцы		-----	-----	-----	-----	10 мкл
DILAS		-----	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл

- Инкубация: 37±2°C, 45 мин.
- Промывка: 4-5 x 300 мкл.

Конъюгат	CONJ	-----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------	------	-------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: 37±2°C, 45 мин.
- Промывка: 4-5 x 300 мкл

Раствор ТМБ	TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------	-----	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: комнатная температура, 15 мин.

Стоп-реагент STOP		100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	--	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм).

Примерная схема нанесения образцов на микропланшет:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	ОБ2										
B	K(-)	ОБ3										
C	K(-)	ОБ4										
D	K(-)	ОБ5										
E	КП	ОБ6										
F	КП	ОБ7										
G	K(+)	ОБ8										
H	ОБ1	ОБ9										

Условные обозначения:

BLK = лунка для обнуления (Blank)

K(-) = отрицательный контроль

КП = калибровочная проба

K(+) = положительный контроль

ОБ - образцы

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем

ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 8 (восемь) лист ев

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



НАБОР РЕАГЕНТОВ HEV IgM ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М К ВИРУСУ ГЕПАТИТА Е В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА HEV IgM

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Вирус гепатита Е (ВГЕ) - недавно открытый вирус с фекально-оральным путем передачи. ВГЕ не имеет оболочки и содержит одноцепочечную РНК. По строению он похож на калицивирусы и был найден в фекалиях больного. ВГЕ это серьезная проблема во многих развивающихся странах. Первая вспышка гепатита Е была зарегистрирована в 1955 году в Нью Дели, Индия. Это заболевание никогда не переходит в хроническую форму, однако характеризуется большой частотой неблагоприятных исходов у беременных женщин.

Изучение генома вируса гепатита Е позволило разработать тест-системы для определения анти-ВГЕ антител. Они основаны на синтетических антигенах из иммунодоминантных консервативных регионов вируса гепатита Е.

Тест-системы для определения IgM используются для дифференциальной диагностики у пациентов с симптомами гепатита и дают возможность исключить другие более тяжелые вирусные инфекции (ВГВ, ВГД, ВГС).

Тест-система HEV IgM предназначена для качественного определения иммуноглобулинов класса М против ВГЕ в сыворотке и плазме крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип работы данного набора основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В качестве ферментной метки в наборе применяется пероксидаза хрена. В течение первой инкубации антитела против ВГЕ (если они есть в образце) связываются с синтетическими антигенами из иммунодоминантных консервативных регионов мексиканской и бирманской линий вируса, адсорбированными на твердой фазе (в лунках планшета). С помощью промывки удаляется несвязавшийся материал. В течение следующей инкубации поликлональные антитела против IgM человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом антиген ВГЕ – антитело. После цикла промывок в лунки добавляется раствор ТМБ, что приводит к развитию окраски под воздействием фермента. Реакция останавливается добавлением Стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 405 нм. Содержание специфических IgM антител в образцах и контролях прямо пропорционально измеренной оптической плотности раствора в лунках.

Нейтрализация анти-ВГЕ IgG и ревматоидного фактора, происходящая в лунке непосредственно во время анализа, нужна для того, чтобы блокировать их интерференцию.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
MICROPLATE Микропланшет	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
CONTROL - Отрицательный контроль	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CONTROL + Положительный контроль	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
WASHBUF 20X 20x Промывочный буфер	1 x 50 мл	Концентрированный раствор Конс.
CONJ Конъюгат	1 x 16 мл	Готов к использованию Ready for use

DILSPE Раствор для разведения образцов	2 x 50 мл	Готов к использованию Ready for use
SOLN NTR Раствор для нейтрализации	1 x 8,0 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MICROPLATE) / Microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок). Лунки стрипов планшета покрыты синтетическими антигенами вируса гепатита Е из регионов ORF2 и ORF3. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).
- **Отрицательный контроль (CONTROL -) / Negative Control:** 1 флакон. Раствор желтого цвета на основе 10 мМ Na-цитратного буфера, pH 6,0±0,1, содержит 1% белков сыворотки козы и 0,5% Твин 20. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.
- **Положительный контроль (CONTROL +) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор темно-зеленого цвета на основе 10 мМ Na-цитратного буфера, pH 6,0±0,1, содержит 1% белков сыворотки козы, 0,5% Твин 20 и IgM человека к вирусу гепатита Е. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.
- **Промывочный раствор 20x (WASHBUF 20X) / Washing buffer concentrate:** 1 флакон. 1x Промывочный раствор представляет собой 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7,0±0,2, содержащий 0,05% Твин 20 и 0,1% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 7 суток при +2...8°C.
- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон. Раствор красного цвета на основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,8±0,1, содержит козы поликлональные антитела к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), 5% БСА, 0,02% гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.
- **Раствор для разведения образцов (DILSPE) / Specimen Diluent:** 2 флакона. Раствор на основе 10 мМ Na-цитратного буфера, pH 6,0±0,1, содержит 2% казеин, 0,1% Твин 20. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.
- **Раствор для нейтрализации (SOLN NTR) / Neutralising Solution:** 1 флакон. Раствор на основе 10 мМ Na-цитратного буфера, pH 6,0±0,1, содержит 2% казеин, 0,1% Твин 20 и козы антитела к IgG человека. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.
- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.
- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**
- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - способность метода определять образцы, не содержащие специфический анализ, как отрицательные. Было протестировано более 500 доноров и пациентов, не имеющих иммунитета к ВГЕ. Диагностическая специфичность относительно FDA-одобренной тест-системы составляет ≥ 98%.

Было протестировано более 100 образцов с потенциальной интерференцией (пациенты с другими инфекционными заболеваниями, с гепатитами невирусной природы, пациенты после диализа, беременные женщины, гемолизированные образцы и образцы с липидемией и т.д.). Специфичность составила 100%.

Не было обнаружено ложноположительных реакций при тестировании анализируемых образцов разных типов.

Не было также обнаружено влияния на специфичность заморозки анализируемых образцов.

Было обнаружено, что образцы с высокой концентрацией ревматоидного фактора, могут давать ложноположительные результаты.

3.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - способность метода определять образцы, содержащие специфический анализ, как положительные. Исследования проводились как на базе RADIM так и на базе

других лабораторий, было протестировано в общей сложности 100 образцов от пациентов, имеющих иммунитет к ВГЕ, из Германии, Мексики и Бирмы. Диагностическая чувствительность составила $\geq 98\%$.

3.3 Прецизионность

Два образца (один отрицательный и один положительный) анализировались в трех независимых постановках. В каждой из постановок образцы были нанесены в 16 репликатах.

Полученные значения КВ попадали в диапазон 5-15% и зависели от величины оптической плотности при 450 нм. Изменения диагнозов образцов обнаружено не было.

3.4 Предел детекции

Этот параметр был определен с помощью Первого Международного Стандарта антител к ВГЕ (NIBSC, 95/584). Этот международный стандарт является слабоположительным на IgM к ВГЕ. Значение полученное при делении его оптической плотности на Cut-off составило $> 1,2$.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты (см. 2.2.1.) разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
 - Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
 - Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
 - Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
 - Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
 - Используйте дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
 - Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
 - Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
 - Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
 - В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
 - Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
 - Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
 - Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
 - Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
 - Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.
- Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:**
- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
 - Не разрешается пипетировать ртом.
 - Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
 - Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
 - Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное

отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

– Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Используемый при этом протирачный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

– Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке

- Микropипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.
- Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

– При заборе венозной крови следует соблюдать правила асептики. Сыворотку или плазму крови получают по общепринятой методике подготовки образцов для лабораторного анализа. Не было обнаружено существенного влияния цитрата, ЭДТА и гепарина на результаты анализа.

– Образцы должны быть четко маркированы во избежание ошибочной интерпретации результатов. Настоятельно рекомендуется применять штрих-кодирование и электронный датчик для считывания штрих-кода, в особенности если набор применяется для скрининга донорской крови.

– Не допускается применять образцы с видимыми признаками гемолиза (красный цвет) и липемии («молочный» оттенок), так как при этом может быть получен ложный результат. По этой же причине не допускается применять образцы, содержащие фибрин, твердые частицы или видимые признаки микробной контаминации.

– Сыворотку и плазму допускается хранить при температуре $+2^\circ\text{C}$.. $+8^\circ\text{C}$ в течение 5 суток после сбора. При необходимости более длительного хранения образцы допускается хранить при температуре -20°C в течение нескольких месяцев. Не допускается повторное замораживание/размораживание образцов, так как образовавшиеся при этом включения могут влиять на результат анализа.

– При обнаружении твердых частиц, образцы перед проведением анализа центрифугируют в течение 20 минут при 2000 об/мин, либо очищают фильтрованием (диаметр пор фильтра 0,2-0,8 мкм).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18^\circ\text{C}$.. $+25^\circ\text{C}$).

– Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Разведите анализируемые образцы 1:101 (например, 1000 мкл буфера для разведения + 10 мкл образца).

7.2. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank), 2 лунки для отрицательного контроля и одну лунку для положительного контроля.

7.3. Внесите во все лунки для образцов по 50 мкл буфера для нейтрализации. Вносить буфер для нейтрализации в лунки для контролей и в лунку для обнуления не нужно.

7.4. Внесите по 100 мкл контролей в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.5. Внесите в соответствующие лунки по 100 мкл разведенных анализируемых образцов.

Примечание: Стрипы следует заклеивать специальной пленкой, входящей в состав набора, только в том случае, если анализ проводится вручную. При автоматической постановке анализа клейкая пленка не требуется.

7.6. Инкубируйте планшет в течение **60 минут при 37 ± 2 °C**.

7.7. Удалите содержимое лунок и с помощью автоматического промывочного устройства промойте микропланшет **4–5 раз** подготовленным к работе Промывочным раствором. При каждой промывке добавляйте по 300 мкл Промывочного раствора в каждую лунку.

7.8. Внесите во все лунки, кроме лунки A1, по 100 мкл Конъюгата. Убедитесь, что окрашенный раствор внесен во все необходимые лунки. Заклейте планшет клейкой пленкой.

Примечание: Во время внесения Конъюгата избегайте прикасаться наконечником пипетки к внутренней стороне лунок во избежание контаминации.

7.9. Инкубируйте микропланшет в течение **60 минут при $+37 \pm 2$ °C**.

7.10. Удалите содержимое лунок и промойте лунки, как описано в п. 7.7.

7.11. Внесите по 100 мкл Раствора ТМБ в каждую лунку, включая A1. Инкубируйте планшет при комнатной температуре ($+18...25$ °C) в течение **20 минут**.

Примечание: Во избежание высокого фонового сигнала, не допускайте попадания света на планшет.

7.12. Остановите ферментативную реакцию добавлением 100 мкл Стоп-реагента в каждую лунку. Стоп-реагент следует вносить в лунки в той же последовательности, как и Раствор ТМБ. После внесения Стоп-реагента окраска Положительного контроля и положительных образцов изменится с голубой на желтую.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 7.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов

Определить среднюю оптическую плотность (ОП) Отрицательного контроля (OK). Рассчитать значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = \text{ОП}_{\text{срOK}} + 0,250$$

Примечание: Если расчет результатов проводится операционной системой автоматического анализатора, следует убедиться, что задана правильная формула для вычисления значения Cut-off и последующего расчета результатов.

Присутствие или отсутствие IgM против ВГЕ определяется путем деления ОП образца на значение Cut-off.

Образцы, для которых при делении на Cut-off получено значение менее 1,0 - признают нереактивными (не содержащими IgM против ВГЕ).

Образцы, для которых при делении на Cut-off получено значение более 1,2 - признают реактивными (содержащими IgM против ВГЕ). Пациент должен получить соответствующую медицинскую помощь.

Область 1,0 – 1,2 является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным. Следует повторить анализ через 1-2 недели, получив для этого свежий образец сыворотки или плазмы.

Примечания:

- Во избежание ошибок, интерпретацию результатов следует проводить под наблюдением руководителя лаборатории.
- Любой положительный результат анализа должен быть подтвержден альтернативным методом, прежде чем будет установлен диагноз «вирусный гепатит».
- При сообщении результатов из лаборатории в другие подразделения следует предпринимать меры для исключения ошибок при передаче данных.
- Устанавливать диагноз «вирусный гепатит» и доводить его до сведения пациента должен персонал, имеющий высшее медицинское образование и соответствующую специальную квалификацию.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных.

ОП репликатов Отрицательного контроля (ед.опт.плот.): 0,060 – 0,080
Среднее значение: 0,070
Критерий достоверности(< 0,100) Выполняется
ОП Положительного контроля(ед.опт.плот.): 1,589
Критерий достоверности (> 0.500) Выполняется
Cut-Off = 0,070+0,250 = 0,320
ОП Образца 1(ед.опт.плот.): 0,070
ОП Образца 2(ед.опт.плот.): 1,690
Для Образца 1 ОП/Cut-off < 1,0 Образец считается отрицательным
Для Образца 2 ОП/Cut-off > 1,2 Образец считается положительным

9.2. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям.

Описание	Условие
Blank	< 0,100
Отрицательный контроль	< 0,100
Положительный контроль	>0,500

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

При несоответствии критериям следует немедленно известить руководство лаборатории. Некоторые возможные причины несоответствия приведены ниже. Перед повторным проведением анализа следует убедиться, что эти причины устранены.

Описание дефекта	Возможная причина
ОП в лунке для обнуления >0,100	Раствор ТМБ был загрязнен в процессе анализа.
ОП Отрицательного контроля > 0,100	1. Не были предварительно подобраны оптимальные параметры промывки и/или настройки промывочного устройства; 2. Использован неподходящий промывочный буфер либо магистрали промывочного устройства не были промыты соответствующим буфером перед началом работы; 3. Ошибка оператора в процессе внесения контролей (положительный контроль вместо отрицательного); 4. Контаминация флакона с Отрицательным контролем, либо лунок, в которые он был внесен, следами положительных образцов или Конъюгата; 5. Загрязнение пипеток следами положительных образцов или Конъюгата; 6. Закупоренные или засоренные иглы автоматического промывочного устройства.
ОП положительного контроля < 0,500	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Положительного контроля; 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Положительного контроля.

9.3. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию IgM против ВГЕ.
- Реактивные и сомнительные образцы признают положительными по содержанию IgM против ВГЕ.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 6 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Было обнаружено, что образцы с высокой концентрацией ревматоидного фактора, могут давать ложноположительные результаты, не смотря на присутствие раствора для нейтрализации.

Замороженные образцы, содержащие фибрин, после разморозки могут давать ложные результаты.

СХЕМА АНАЛИЗА

Реагенты \ Лунки	Blank	CONTROL -	CONTROL +	Образцы (разведенные 1:101)
SOLN NTR	-----	-----	-----	50 мкл
CONTROL -	-----	100 мкл	-----	-----
CONTROL +	-----	-----	100 мкл	-----
Образцы (разведенные 1:101)	-----	-----	-----	100 мкл

- Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 60 мин.
- Промывка: 4-5 x 300 мкл.

Конъюгат CONJ	-----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------------	-------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 60 мин.
- Промывка: 4-5 x 300 мкл

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
------------------------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: комнатная температура, 20 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------------------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм).

Примерная схема нанесения образцов на микропланшет:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	ОБ5										
B	K(-)	ОБ6										
C	K(-)	ОБ7										
D	K(+)	ОБ8										
E	ОБ1	ОБ9										
F	ОБ2	ОБ10										
G	ОБ3	ОБ11										
H	ОБ4	ОБ12										

Условные обозначения:

BLK = лунка для обнуления (Blank)

K(-) = отрицательный контроль

K(+) = положительный контроль

ОБ - образцы

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 8 (восемь) лист 06

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



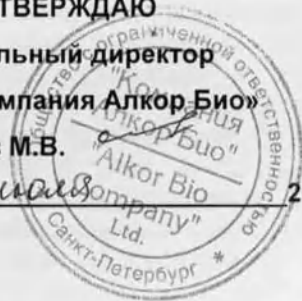
«УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

« 12 » мая 2011г



**НАБОР РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
HCV Ab**

Только для in vitro диагностики

***Набор разрешается применять для скрининга препаратов донорской крови
и мониторинга пациентов, инфицированных вирусом гепатита С***

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) дает следующее определение Гепатита С: «Гепатит С представляет собой вирусную инфекцию печени. До того, как в 1989 г. был идентифицирован возбудитель, это заболевание было известно как передаваемый парентеральным путем «Гепатит не А, не В». После того, как вирус Гепатита С (ВГС) был открыт и охарактеризован, стала очевидна его роль в возникновении посттрансфузионных гепатитов и тенденция вызывать персистирующую инфекцию.

ВГС является одной из основных причин острого гепатита и хронического поражения печени, приводящего к циррозу и раку печени. По некоторым оценкам, 170 миллионов человек во всем мире хронически инфицированы ВГС, от 3 до 4 миллионов человек заражаются ежегодно. ВГС передается преимущественно при контакте с кровью человека. Основной причиной инфицирования во всем мире является переливание необследованной крови и повторное использование шприцев и игл без надлежащей стерилизации. В настоящее время не существует вакцины против Гепатита С, а стоимость лечения хронической формы гепатита слишком высока для большинства жителей развивающихся стран. Таким образом, наиболее перспективными методами борьбы с Гепатитом С в общемировом масштабе являются меры по предотвращению риска передачи вируса при медицинских процедурах (переливании крови, инъекциях и т.п.) и в социальных группах повышенного риска (например, при внутривенном употреблении наркотиков)».

ВГС, наряду с вирусами гепатитов А, В и D – один из группы вирусов, которыми вызвано большинство случаев вирусного гепатита. Это покрытый оболочкой вирус семейства Flaviviridae, содержащий РНК. Спектр хозяев вируса очень узок. На данный момент достоверно известно о способности вируса инфицировать только два вида – человека и шимпанзе. У обоих видов после инфицирования наблюдается сходная картина заболевания. Важной отличительной чертой вируса является достаточно высокая изменчивость его генома, с которой, в свою очередь, может быть связана выраженная тенденция возбудителя вызывать хроническую инфекцию (до 80% случаев). ВГС подразделяется на несколько генотипов. Определение генотипа важно для прогноза степени тяжести заболевания и эффективности лечения.

Инкубационный период варьирует от 15 до 150 дней. При острой форме инфекции наиболее частыми симптомами являются слабость и желтуха. Однако, большинство случаев (60-70%), включая случаи хронической инфекции, протекает бессимптомно. Хроническая инфекция развивается примерно у 80% инфицированных. За последующие 20-30 лет у 10-20% пациентов с хронической инфекцией развивается цирроз печени, а у 1-5% - рак печени. Большинство пациентов с раком печени, у которых не было обнаружено признаков инфицирования вирусом гепатита В, имели признаки инфицирования ВГС. Механизм развития рака под воздействием ВГС остается неясным. Кроме того, при Гепатите С существенно усиливается тяжесть других патологий печени. В частности, у пациентов с алкогольным поражением печени в сочетании с Гепатитом С поражение печени прогрессирует значительно быстрее.

Преимущественный путь распространения ВГС – непосредственный контакт с человеческой кровью. Имеются многочисленные подтверждения факта передачи вируса через переливание необследованной крови, нестерильные многоразовые шприцы, иглы и т.п. медицинское оборудование, а также через общие иглы при внутривенном введении наркотиков. Половой и

перинатальный путь передачи также возможен, но встречается намного реже. Возможны и другие пути передачи, например через культурные или социальные ритуалы, при которых нарушается целостность кожных покровов (татуировки, пирсинг, ритуальное обрезание и т.п.), если используемые инструменты не подвергаются надлежащей стерилизации. ВГС не распространяется через кашель и чихание, пищу и воду, общие столовые приборы или при бытовых контактах.

Как в развитых, так и в развивающихся странах группу особого риска составляют внутривенные наркоманы, реципиенты необследованной донорской крови, гемофилики, пациенты, подвергавшиеся гемодиализу, и лица, имеющие многочисленные незащищенные половые контакты. В развивающихся странах до 90% пациентов с хронической формой Гепатита С получали необследованную донорскую кровь или продукты крови, либо имели опыт внутривенного употребления наркотиков в прошлом или настоящем. По оценке ВОЗ, до 170 миллионов человек (3% мирового населения) инфицированы вирусом Гепатита С и характеризуются повышенным риском развития цирроза и/или рака печени. По сравнению со странами Северной Америки и Европы частота случаев инфицирования вирусом Гепатита С высока в странах Африки, Восточного Средиземноморья, Юго-Восточной Азии и в западной части Тихоокеанского региона.

Диагностические тесты для обнаружения ВГС используются для скрининга донорской крови и плазмы (что позволяет предотвратить распространение инфекции), для подтверждения диагноза и при выборе стратегии лечения больного. В настоящее время имеются коммерческие иммуноферментные тест-системы для обнаружения специфических антител к ВГС. Эти наборы позволяют выявить более 95% случаев хронического инфицирования, но только 50-70% случаев острой инфекции. Для подтверждения положительного результата иммуноферментного анализа часто используется иммуноблоттинг на основе рекомбинантных белков. Этот метод позволяет определить антитела к отдельным антигенам вируса. Для подтверждения результатов серологических исследований и для оценки эффективности противовирусной терапии применяются методы, основанные на обнаружении РНК вируса, такие как ПЦР. Положительный результат анализа означает наличие активной инфекции и потенциальный риск распространения инфекции и/или развития хронических заболеваний печени.

Для лечения пациентов с хроническим Гепатитом С применяются противовирусные препараты, такие как интерферон, либо интерферон в комбинации с рибавирином, однако, стоимость лечения в этом случае очень высока. Терапия только интерфероном эффективна у 10-20% пациентов, интерфероном и рибавирином – у 30-50%. Применение только рибавирина представляется неэффективным.

Вакцины против Гепатита С не существует. В этом направлении ведутся интенсивные исследования, однако разработку вакцины затрудняет как высокая частота мутаций в геноме вируса, так и отсутствие достоверных сведений о защитном иммунном ответе вследствие инфекции. До сих пор неизвестно, способна ли иммунная система организма ликвидировать вирус. Однако отдельными исследованиями было показано присутствие нейтрализующих антител у пациентов, инфицированных ВГС.

При отсутствии вакцины, основные меры предотвращения инфекции должны включать: (а) скрининг доноров крови и тканей; (б) инаktivация вируса в препаратах, полученных из плазмы крови; (с) внедрение противозидемических мероприятий в медицинскую практику (в частности, надлежащая стерилизация медицинских и стоматологических инструментов); (д) пропаганда соответствующих стереотипов поведения среди населения в целом и медработников в частности с целью сократить злоупотребление инъекциями (е) просветительская работа в группах высокого риска, злоупотребляющих наркотиками и сексуальными контактами.

В геноме вируса закодированы отдельные структурные компоненты: белок нуклеокапсида, два гликопротеина наружной оболочки и несколько функциональных белков, ответственных за репликацию вируса и формирование его белков.

При сравнении изолятов вируса, полученных по всему миру, наиболее консервативной представляется область генома, кодирующая белок нуклеокапсида.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

На внутренней поверхности лунок микропланшета иммобилизованы антигены ВГС (рекомбинантные пептиды core, NS3, NS4 и NS5). Эти пептиды закодированы участками генома "core" и "ns" и представляют собой консервативные антигенные детерминанты, доминирующие при иммунном ответе.

В лунки планшета вносятся предварительно разведенные образцы. Присутствующие в образцах антитела к ВГС связываются с антигенами, иммобилизованными на твердой фазе.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. После этого в лунки добавляется конъюгат поликлональных антител к иммуноглобулинам М и G человека с пероксидазой, который связывается с иммобилизованными на твердой фазе антителами.

После промывки в лунки добавляется раствор хромогена в субстратном буфере, что приводит к развитию окраски под воздействием пероксидазы. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации антител к ВГС в образце. Интерпретация полученных результатов осуществляется с помощью значения Cut-off.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество		Состояние
	1-й вариант комплектации	2-й вариант комплектации	
MICROPLATE Микропланшет	1 x 96 лунок	2 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
CONTROL - Отрицательный контроль	1 x 4,0 мл	2 x 4,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CONTROL + Положительный контроль	1 x 2,0 мл	1 x 4,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CAL Калибровочная проба	2 флакона	4 флакона	Лиофилизированный препарат
WASHBUF 20X 20x Промывочный буфер	1 x 50 мл	2 x 50 мл	Концентрированный раствор Conc.
CONJ Конъюгат	1 x 16 мл	2 x 16 мл	Готов к использованию Ready for use
SUBS TMB Раствор хромогена в субстратном буфере	1 x 16 мл	2 x 16 мл	Готов к использованию Ready for use
DILAS Аналитический буфер	3 x 3,0 мл	5 x 4,0 мл	Готов к использованию Ready for use
DILSPE Раствор для разведения образцов	1 x 50 мл	1 x 100 мл	Готов к использованию Ready for use
H₂SO₄ 0.3 M Стоп-реагент	1 x 16 мл	2 x 16 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 или на 192 лунки

2.2.1. РЕАГЕНТЫ

• Микропланшет **MICROPLATE**

Набор на 96 определений: 1 штука

Набор на 192 определения: 2 штуки

12 разборных стрипов по 8 лунок каждый. На внутренней поверхности лунок иммобилизованы рекомбинантные пептиды core, NS3, NS4 и NS5. Стрипы упакованы в полиэтиленовый пакет с осушителем воздуха.

• Отрицательный контроль **CONTROL -**

Набор на 96 определений: 1 флакон (4 мл)

Набор на 192 определения: 2 флакона (по 4 мл каждый)

Готов к использованию. Раствор содержит 10 мМ натрий-цитратный буфер (pH 6.0 +/-0.1), 1% белков козьей сыворотки, 0.5% Твин 20 и консерванты (0.09% азид натрия и 0.1% Kathon GC).

Раствор желто-зеленого цвета.

• Положительный контроль **CONTROL +**

Набор на 96 определений: 1 флакон (2 мл)

Набор на 192 определения: 1 флакон (4 мл)

Готов к использованию. Раствор содержит 10 мМ натрий-цитратный буфер (pH 6.0 +/-0.1), человеческие антитела к вирусу гепатита С, 1% белков козьей сыворотки, 0.5% Твин 20 и консерванты (0.09% азид натрия и 0.1% Kathon GC).

Раствор темно-зеленого цвета.

• Калибровочная проба **CAL**

Набор на 96 определений: 2 флакона

Набор на 192 определения: 4 флакона

Лиофилизированный препарат.

Перед использованием растворить содержимое флакона в указанном на этикетке объеме дистиллированной воды. Препарат содержит 10 мМ натрий-цитратный буфер (pH 6.0 +/-0.1), fetalную сыворотку крупного рогатого скота, человеческие антитела к ВГС и консерванты (0.3

мг/мл гентамицина сульфат и 0.1% Kathon GC). Калибровочная проба аттестована по Британскому Рабочему стандарту антител к ВГС (код NIBSC 99/588-003-WI).

Примечание: Объем дистиллированной воды, необходимый для растворения содержимого флакона, может быть различным для разных вариантов комплектаций реагента. Обратите внимание, чтобы препарат был растворен именно в том объеме воды, который указан на этикетке флакона.

• **Концентрат промывочного буфера** **WASHBUF** **20X**

Набор на 96 определений: 1 флакон (50 мл)

Набор на 192 определения: 2 флакона (по 50 мл каждый)

Концентрированный раствор (20x).

После разведения 1x раствор представляет собой 10 mM фосфатный буфер (pH 7.0+/-0.2), содержащий 0.05% Твин 20 и 0.1% Kathon GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20.

• **Конъюгат** **CONJ**

Набор на 96 определений: 1 флакон (16 мл)

Набор на 192 определения: 2 флакона (по 16 мл каждый)

Готов к использованию. Раствор содержит 10 mM буфер Трис (pH 6.8+/-0.1), 5% бычьего сывороточного альбумина, конъюгат козьих поликлональных антител к IgG и IgM человека с пероксидазой и консерванты (0.1% Kathon GC и 0.02% гентамицина сульфат).

Раствор красного цвета.

• **Раствор хромогена в субстратном буфере** **SUBS** **TMB**

Набор на 96 определений: 1 флакон (16 мл)

Набор на 192 определения: 2 флакона (по 16 мл каждый)

Раствор содержит 50 mM цитратно-фосфатный буфер (pH 3.5-3.8); 4% диметилсульфоксида, 0.03% тетраметилбензидина (ТМБ) и 0.02% перекиси водорода (H₂O₂).

Примечание: раствор чувствителен к действию света. Хранить в защищенном от света месте.

• **Аналитический буфер** **DILAS**

Набор на 96 определений: 3 флакона (по 3 мл каждый)

Набор на 192 определения: 5 флаконов (по 4 мл каждый)

Готов к использованию. Раствор представляет собой 10 mM буфер Трис (pH 8.0 +/-0.1), содержащий 0.1% Kathon GC.

Примечание: Раствор легко подвергается окислению. Израсходуйте все содержимое одного флакона, прежде чем вскрывать следующий флакон.

• **Стоп-реагент** **H₂SO₄** **0.3 M**

Набор на 96 определений: 1 флакон (16 мл)

Набор на 192 определения: 2 флакона (по 16 мл каждый)

0.3 M раствор серной кислоты.

Внимание: вызывает раздражение кожи и слизистых (Xi R36/38; S2/26/30)

• **Раствор для разведения образцов:** **DILSPE**

Набор на 96 определений: 1 флакон (50 мл)

Набор на 192 определения: 1 флакон (100 мл)

Готов к использованию. Раствор содержит 10 mM натрий-цитратный буфер (pH 6.0 +/-0.1), 1% белков козьей сыворотки, 0.5% Твин 20 и консерванты (0.09% азид натрия и 0.1% Kathon GC).

• **Пленка для заклеивания планшета:**

Набор на 96 определений: 2 шт.

Набор на 192 определения: 4 шт.

• **Инструкция по применению набора – 1 шт.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая специфичность

Термин «диагностическая специфичность» означает способность анализа давать отрицательный результат при отсутствии специфического аналита в образце. Для определения диагностической специфичности исследовали образцы более чем 5000 доноров, сдававших кровь впервые. В качестве метода сравнения использовали набор, разрешенный к применению FDA США. При обследовании 5043 доноров диагностическая специфичность составила 99.5%. При обследовании 210 госпитализированных пациентов значение диагностической специфичности составило 99.5%.

Кроме того, для оценки диагностической специфичности исследовали 162 образца, потенциально способных проявлять интерференцию в настоящем анализе (от пациентов с другими инфекционными заболеваниями и невирусными гепатитами, с высоким титром антител к белкам E.coli, после процедуры гемодиализа, от беременных женщин, а также гемолизированные и липемичные образцы). Диагностическая специфичность составила 100%.

При исследовании специфичности наряду с образцами сыворотки были использованы образцы плазмы крови, полученные несколькими стандартными методами с использованием цитрата, солей ЭДТА и гепарина. Не было отмечено случаев ложноположительных реакций, связанных со способом подготовки образцов.

С целью проверить влияние условий сбора и хранения образцов на результат были исследованы замороженные образцы. Влияния замораживания на результат анализа отмечено не было.

3.2 Диагностическая чувствительность

Термин «диагностическая чувствительность» означает способность анализа давать положительный результат при наличии в образце специфического аналита.

Для определения диагностической чувствительности 359 образцов были исследованы в независимой лаборатории. Диагностическая чувствительность составила 100%. При исследовании 50 образцов в лаборатории изготовителя диагностическая чувствительность также составила 100%. В исследование были включены положительные образцы от пациентов, инфицированных разными генотипами ВГС.

Были также исследованы панели сероконверсии производства компании Boston Biomedica Inc. (США). Результаты измерения приведены в таблице:

Панель сероконверсии WWHV 301

Образец	Результат измерения ОП/ Cut-off	Результат измерения набором Ortho HCV 3 ОП/ Cut-off	Образец	Результат измерения ОП/ Cut-off	Результат измерения набором Ortho HCV 3 ОП/ Cut-off
01	11.3	> 5.0	11	3.2	> 5.0
02	11.3	> 5.0	12	11.3	> 5.0
03	11.3	> 5.0	13	11.3	> 5.0
04	10.7	> 5.0	14	11.2	> 5.0
05	0.1	0.0	15	8.0	> 5.0
06	11.2	> 5.0	16	6.3	> 5.0
07	4.2	> 5.0	17	9.0	> 5.0
08	0.2	0.1	18	10.6	> 5.0
09	8.5	> 5.0	19	1.6	> 5.0
10	11.3	> 5.0	20	10.7	> 5.0

Панель PHV 920

Образец	Результат измерения ОП/ Cut-off	Результат измерения набором Ortho HCV 3 ОП/ Cut-off
01	0.1	0.0
02	0.1	0.0
03	0.2	0.0
04	0.7	0.4
05	2.0	2.1
06	4.4	2.9
07	4.7	> 4.8
08	4.9	> 4.8
09	5.7	> 4.8
10	6.2	> 4.8

Панель PHV 908

Образец	Результат измерения ОП/ Cut-off	Результат измерения набором Ortho HCV 3 ОП/ Cut-off
01	0.2	0.0
02	0.2	0.0
03	0.2	0.0
04	0.4	0.5
05	0.5	0.7
06	1.4	1.6
07	3.7	3.2
08	5.2	3.7
09	6.0	4.5
10	7.2	4.8
11	7.9	4.9
12	8.1	5.1
13	8.2	5.1

Панель PHV 905

Образец	Результат измерения ОП/ Cut-off	Результат измерения набором Ortho HCV 3 ОП/ Cut-off
01	0.2	0.0
02	0.2	0.0
03	0.2	0.0
04	0.4	0.5
05	0.5	0.7
06	1.4	1.6
07	3.7	3.2
08	5.2	3.7
09	6.0	4.5

Кроме того, была исследована панель EFS Ac HCV производства компании Etablissement Francais Du Sang, Франция, (серия° 01/08.03.22C/01/A):

Панель EFS Ac HCV

Образец	Набор серии № 1 ОП/ Cut-off	Набор серии № 2 ОП/ Cut-off	Набор серии № 3 ОП/ Cut-off	Ожидаемый результат
HCV 1	2,2	2,4	2,6	положительный
HCV 2	1,6	2,0	2,1	положительный
HCV 3	1,5	1,7	1,6	положительный
HCV 4	5,2	6,5	5,5	положительный
HCV 5	1,6	1,8	1,6	положительный
HCV 6	0,4	0,4	0,4	отрицательный

3.3 Аналитическая специфичность

Для определения этого параметра два образца (отрицательный и слабopоложительный) были исследованы в 16 репликатах каждый в трех независимых экспериментах:

Набор серии № 1202

Отрицательный образец (N = 16)

Средние значения	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3	Среднее значение
------------------	---------------	---------------	---------------	------------------

ОП при длине волны 450 нм	0,094	0,099	0,096	0,096
Стандартное отклонение	0,008	0,007	0,008	0,007
КВ, %	8,7	6,6	7,9	7,7

КП №2 (N = 16)

Средние значения	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3	Среднее значение
ОП при длине волны 450 нм	0,396	0,403	0,418	0,406
Стандартное отклонение	0,023	0,029	0,027	0,026
КВ, %	5,9	7,1	6,4	6,5
Отношение ОП/Cut-off	1,1	1,1	1,2	1,1

Отрицательный образец (N = 16)

Средние значения	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3	Среднее значение
ОП при длине волны 450 нм	0.097	0.096	0.094	0.096
Стандартное отклонение	0.009	0.010	0.008	0.009
КВ, %	8.9	10.1	8.4	9.1

КП № 2 (N = 16)

Средние значения	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3	Среднее значение
ОП при длине волны 450 нм	0.400	0.395	0.393	0.396
Стандартное отклонение	0.021	0.025	0.026	0.024
КВ, %	5.4	6.2	6.6	6.1
Отношение ОП/Cut-off	1.2	1.2	1.1	1.2

Отрицательный образец (N = 16)

Средние значения	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3	Среднее значение
ОП при длине волны 450 нм	0,087	0,091	0,088	0,089
Стандартное отклонение	0,009	0,007	0,008	0,008
КВ, %	10,0	8,2	8,6	8,9

КП № 2 (N = 16)

Средние значения	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3	Среднее значение
ОП при длине волны 450 нм	0,386	0,390	0,391	0,389
Стандартное отклонение	0,023	0,021	0,023	0,022
КВ, %	6,0	5,3	5,8	5,7
Отношение ОП/Cut-off	1,1	1,2	1,2	1,2

Наблюдаемая вариабельность не была вызвана ошибочной идентификацией образцов.

3.4 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выражается минимальным количеством определяемого аналита, выявляемым с помощью данного метода. Этот параметр был определен с помощью Британского Рабочего стандарта антител к ВГС (код NIBSC 99/588-003-WI). Были исследованы различные

разведения этого стандарта в плазме крови человека, не содержащей антител к ВГС. Результаты измерения (отношение ОП образца/Cut-off) приведены в таблице:

Разведение стандарта	Набор серии №1	Набор серии № 2
1 X	2,0	2,0
2 X	1,1	1,2
4 X	0,7	0,8
8 X	0,5	0,5
Плазма крови, не содержащая антител к ВГС	0,3	0,3

Дополнительно был исследован контрольный образец Accurun 1 series 3000 производства компании Boston Biomedica Inc., США:

Номер серии	Номер серии Accurun 1	Отношение ОП образца/ Cut-off
1201	3000	1,5
0602	3000	1,5
1202	3000	1,9

7 образцов, давших положительные результаты при исследовании набором Ortho HCV 3.0 SAVE (серия № EXE065-1), были разведены плазмой крови, не содержащей антител к ВГС. Полученные предельные разведения были повторно исследованы наборами Ortho и RADIM (серия № 1202). Результаты измерения приведены ниже:

Образец	Предельное разведение	Результат измерения набором ОП/ Cut-off	Результат измерения набором Ortho 3.0 ОП/ Cut-off
1	256 X	1,9	1,3
2	256 X	1,9	0,7
3	256 X	2,4	1,0
4	128 X	2,5	3,2
5	85 X	3,3	1,4
6	128 X	2,2	0,8
7	135 X	3,2	2,2

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

– Проведение анализа требует специальной квалификации лабораторного персонала. Исследование должно выполняться под руководством лица, имеющего высшее медицинское образование.

– Если набор предполагается использовать для скрининга донорской крови и ее компонентов, лаборатория должна иметь соответствующий сертификат и разрешение национальных органов власти (Министерства здравоохранения или аналогичного учреждения) на проведение такого вида анализов.

– При работе с набором персонал должен надевать лабораторную спецодежду, защитные очки и резиновые перчатки, не содержащие талька. Следует избегать использования колющих и режущих инструментов (например, игл и лезвий). Весь персонал должен пройти специальную подготовку по мерам биологической безопасности в соответствии с рекомендациями Национального института здравоохранения (Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства Здравоохранения СССР, 1981).

– Весь персонал, имеющий контакт с образцами сыворотки и плазмы крови, должен быть вакцинирован против Гепатитов А и В.

– При вскрытии упаковок с компонентами набора и во время проведения анализа следует принимать меры по защите от попадания пыли или микроорганизмов из окружающего воздуха. Раствор хромогена в субстратном буфере следует беречь от света. Во время проведения анализа следует исключить вибрацию поверхности рабочего стола.

– Не допускается использовать в одном анализе компоненты набора из различных партий. Использование в одном анализе компонентов двух разных наборов одной партии не рекомендуется.

– Перед проведением анализа следует убедиться, что все реагенты прозрачны и не содержат видимых твердых частиц или осадков.

– Для предотвращения взаимного загрязнения образцов следует использовать отдельный одноразовый наконечник для каждого образца.

- Для предотвращения взаимного загрязнения реагентов следует использовать отдельный одноразовый наконечник для каждого реагента.
- Не допускается использовать набор по истечении срока годности, указанного на наружной упаковке и этикетках флаконов.
- Все образцы пациентов следует считать потенциально инфекционными. В отношении образцов сыворотки следует соблюдать требования 2б класса санитарно-противоэпидемической безопасности, как рекомендовано в руководстве «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства Здравоохранения» СССР, 1981.
- Для предотвращения загрязнения реагентов рекомендуется при приготовлении промывочного буфера и других манипуляциях использовать одноразовую пластиковую лабораторную посуду.
- При уничтожении образовавшихся в процессе использования набора отходов следует руководствоваться национальными нормативными документами, регламентирующими обращение с химическими, биологическими отходами. В частности, жидкие отходы, образовавшиеся при промывании планшетов и утилизации остатков контролей и образцов, следует считать потенциально инфекционным материалом и соответственно инактивировать. Рекомендуемые методы инактивации: обработка раствором хлорной извести с конечной концентрацией 10% в течение 16-18 часов, либо автоклавирование при температуре 121°C в течение 20 минут.
- Случайно пролитый материал следует собрать бумажным полотенцем, смоченным раствором хлорной извести. Затем загрязненный участок протереть бумажным полотенцем, смоченным водой. Использованный протирочный материал собрать в специальный контейнер для лабораторного мусора и утилизировать соответствующим образом.
- Стоп-реагент вызывает раздражение кожи слизистых. В случае разбрызгивания следует промыть загрязненный участок большим количеством воды.
- Прочие отходы, образовавшиеся при работе с набором (например, использованные микропланшеты или наконечники) следует считать потенциально инфекционным материалом и утилизировать в соответствии с национальными нормативами по утилизации лабораторных отходов.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
 - Дистиллированная или деионизованная вода.
 - Таймер, рассчитанный на 60 и более минут.
 - Бумажные полотенца.
 - Защитные перчатки.
 - Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
 - Термостатируемый инкубатор для микропланшетов (суховоздушный или водяной), позволяющий поддерживать температуру $+37^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$.
 - Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения при длинах волн 450 и 405 нм. Желательно наличие дополнительного светофильтра 620-630 нм (длина волны сравнения).
 - Автоматическое устройство для промывки микропланшетов.
 - Устройство для перемешивания образцов (вортекс).
 - Миллиметровая бумага.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

- При заборе венозной крови следует соблюдать правила асептики. Сыворотку или плазму крови получают по общепринятой методике подготовки образцов для лабораторного анализа. Не было обнаружено существенного влияния цитрата, солей ЭДТА и гепарина на результаты анализа.
- Образцы должны быть четко маркированы во избежание ошибочной интерпретации результатов. Настоятельно рекомендуется применять штрих-кодирование и электронный датчик для считывания штрих-кода, в особенности если набор применяется для скрининга донорской крови.
- Не допускается применять образцы с видимыми признаками гемолиза (красный цвет) и липемии («молочный» оттенок), так как при этом может быть получен ложный результат. По этой же причине не допускается применять образцы, содержащие фибрин, твердые частицы или видимые признаки микробной контаминации.

- Сыворотку и плазму допускается хранить при температуре $+2^{\circ}\text{C}$.. $+8^{\circ}\text{C}$ в течение 5 суток после сбора. При необходимости более длительного хранения образцы допускается хранить при температуре -20°C в течение нескольких месяцев. Не допускается повторное замораживание/размораживание образцов, так как образовавшиеся при этом включения могут влиять на результат анализа.
- При обнаружении твердых частиц, образцы перед проведением анализа центрифугируют в течение 20 минут при 2000 об/мин, либо очищают фильтрованием (диаметр пор фильтра 0,2-0,8 мкм).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

7.1. Автоматическая постановка анализа

Если анализ проводится на автоматическом анализаторе, рекомендуется задать настройки таким образом, чтобы дозатор сначала отбирал 200 мкл Раствора для разведения образцов, затем 10 мкл образца и после этого вся смесь переносилась непосредственно в лунку планшета. Перед отбором следующего образца игла дозатора должна быть тщательно промыта во избежание взаимного загрязнения образцов. Контроли и калибровочная проба вносятся в соответствующие лунки в количестве 200 мкл.

Примечания: 1) Рекомендуется визуально проконтролировать правильность разведения и внесения образцов. Следует убедиться, что окраска отрицательного контроля осталась желто-зеленой, а окраска всех остальных образцов изменилась на темную сине-зеленую.

2) При автоматической постановке анализа не требуется заклеивать стрипы клейкой пленкой.

При выполнении последующих операций следуйте рекомендациям, изложенным в разделе «Ручная постановка анализа».

Настоятельно рекомендуется настроить прибор таким образом, чтобы промежуток времени между внесением первого и последнего образца был зафиксирован и учтен при последующей промывке.

7.2. Ручная постановка анализа

7.2.1. Установите на рамку необходимое количество стрипов. Лунку A1 оставьте пустой для обнуления прибора (Blank).

7.2.2. Внесите в соответствующие лунки **по 200 мкл** Отрицательного контроля (в трех репликатах), **200 мкл** Положительного контроля (в монопликате) и **по 200 мкл** Калибровочной пробы (в дубликате). Контроли и Калибровочная проба не требуют предварительного разведения!

7.2.3. Добавьте во все лунки, предназначенные для исследуемых образцов, **по 200 мкл** Раствора для разведения образцов. Затем добавьте в каждую лунку **по 10 мкл** соответствующего образца. Осторожно перемешайте, избегая расплескивания во избежание контаминации соседних лунок.

Примечание: Убедитесь, что образцы были действительно добавлены в лунки. Это можно установить по изменению окраски раствора с желто-зеленой на темную сине-зеленую.

7.2.4. Внесите во все лунки с образцами, Контролями и Калибровочной пробой **по 50 мкл** Аналитического буфера. Убедитесь, что окраска раствора в лунках изменилась на синюю.

7.2.5. Заклейте стрипы специальной пленкой, входящей в состав набора и инкубируйте микропланшет **в течение 45 минут при $+37^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$** .

7.2.6. С помощью автоматического промывочного устройства промойте микропланшет **4–5 раз** подготовленным к работе Промывочным буфером. При каждой промывке добавляйте **по 350 мкл** Промывочного буфера в каждую лунку.

7.2.7. Внесите во все лунки, кроме лунки A1, **по 100 мкл** Конъюгата. Убедитесь, что окрашенный раствор внесен во все необходимые лунки. Заклейте планшет клейкой пленкой.

Примечание: Во время внесения Конъюгата избегайте прикасаться наконечником пипетки к внутренней стороне лунок во избежание контаминации.

7.2.8. Инкубируйте микропланшет **в течение 45 минут при $+37^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$** .

7.2.9. Промойте микропланшет (см. п.7.2.6.).

7.2.10. Внесите **по 100 мкл** Раствора хромогена в субстратном буфере в каждую лунку, включая A1.

7.2.11. Инкубируйте планшет **при комнатной температуре ($+18\ldots 25^{\circ}\text{C}$) в течение 15 минут**.

Примечание: Во избежание высокого фонового сигнала, не допускайте попадания света на планшет.

7.2.12. Остановите ферментативную реакцию добавлением **100 мкл** Стоп-реагента в каждую лунку. Стоп-реагент следует вносить в лунки в той же последовательности, как и Раствор хромогена на стадии 7.2.10. После внесения Стоп-реагента окраска Положительного контроля и положительных образцов изменится с голубой на желтую.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 13.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: при использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Критерии достоверности

При каждой постановке анализа производится проверка правильности определения, которая позволяет удостовериться в том, что аналитические характеристики набора соответствуют заданным нормативам.

Следует убедиться, что выполняются следующие условия:

Контролируемый показатель	Требуемое значение:
Оптическая плотность (ОП) раствора в лунке для обнуления (Blank)	<0,100 (при длине волны 450 нм)
ОП Отрицательного контроля	<0,050 (при длине волны 450 нм, после обнуления)
ОП Калибровочной пробы	Отношение ОП/Cut-off > 1,1
ОП Положительного контроля	>1,000 (при длине волны 450 нм)

В том случае, если указанные выше условия выполняются, переходите к расчету результатов.

В противном случае результат анализа считается недостоверным. При обнаружении недостоверного результата следует немедленно известить руководство лаборатории. Некоторые возможные причины недостоверных результатов приведены ниже. Перед повторным проведением анализа следует убедиться, что эти причины устранены.

Описание дефекта	Возможная причина
ОП в лунке для обнуления >0,100	Раствор ТМБ в субстратном буфере был загрязнен в процессе анализа.
ОП Отрицательного контроля > 0,050	1. Не были предварительно подобраны оптимальные параметры промывки и/или настройки промывочного устройства; 2. Использован неподходящий промывочный буфер либо магистрали промывочного устройства не были промыты соответствующим буфером перед началом работы; 3. Ошибка оператора в процессе внесения контролей (положительный контроль вместо отрицательного); 4. Контаминация флакона с Отрицательным контролем, либо лунок, в которые он был внесен, следами положительных образцов или Конъюгата; 5. Загрязнение пипеток следами положительных образцов или Конъюгата; 6. Закупоренные или засоренные иглы автоматического промывочного устройства.
Калибровочная проба: отношение ОП/ Cut-off < 1,1	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Калибровочной пробы (например, вместо нее внесен Отрицательный контроль); 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Калибровочной пробы.
ОП Положительного контроля < 1,000	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Положительного контроля; 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Положительного контроля.

9.2. Вычисление значения Cut-off

Для расчета результатов применяется значение cut-off, которое определяют по формуле:

$$\text{Cut-Off} = \text{Среднее значение ОП Отрицательного контроля} + 0.350$$

Полученное значение используется для интерпретации результатов (см. далее.)

Примечание: Если расчет результатов проводится операционной системой автоматического анализатора, следует убедиться, что задана правильная формула для вычисления значения cut-off и последующего расчета результатов.

9.3. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании соотношения ОП образца/Cut-off:

Отношение ОП/ Cut-off	Интерпретация результата
< 0,9	Отрицательный
0,9 - 1,1	Сомнительный
> 1,1	Положительный

Отрицательный результат означает, что пациент не был инфицирован ВГС и что данный препарат донорской крови можно использовать для переливания.

У всех пациентов с сомнительным результатом следует повторить анализ через 1-2 недели, получив для этого свежий образец сыворотки или плазмы. Препарат донорской крови, давший сомнительный результат, не допускается использовать для переливания.

Положительный результат анализа указывает на наличие инфекции ВГС. Пациент должен получить соответствующую медицинскую помощь, а препарат донорской крови должен быть уничтожен.

Примечания:

- Во избежание ошибок, интерпретацию результатов следует проводить под наблюдением руководителя лаборатории.

- Любой положительный результат анализа должен быть подтвержден альтернативным методом (подтверждающим тестом, предназначенным для определения антител класса IgG), прежде чем будет установлен диагноз «вирусный гепатит».

- При определении аналитических характеристик набора было показано, что данный анализ способен обнаруживать сероконверсию (появление антител к core-антигену ВГС) ранее некоторых

других коммерческих наборов. Следовательно, положительный результат, не совпадающий с результатами других коммерческих тестов, нельзя однозначно считать ложноположительным. Такие образцы в любом случае следует исследовать с помощью подтверждающего теста.

• Поскольку настоящий анализ способен определять в том числе и антитела класса IgM, его результаты могут в ряде случаев не совпадать с результатами других коммерческих наборов для определения антител к ВГС, в состав которых не входит конъюгат антител к IgM человека с пероксидазой. Подобные наборы не позволяют обнаруживать антитела класса IgM, поэтому в таких случаях для правильной диагностики инфицирования ВГС требуется анализ, подтверждающий наличие IgM.

• При сообщении результатов из лаборатории в другие подразделения следует предпринимать меры для исключения ошибок при передаче данных.

• Устанавливать диагноз «вирусный гепатит» и доводить его до сведения пациента должен персонал, имеющий высшее медицинское образование и соответствующую специальную квалификацию.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 2 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Менее чем у 1% нормальной популяции людей отмечается воспроизводимый ложноположительный результат анализа.

СХЕМА АНАЛИЗА

Контроли и Калибровочная проба	200 мкл
Раствор для разведения образцов	200 мкл
Образец	10 мкл
Аналитический буфер	50 мкл
1 инкубация 45 минут При температуре +37°C	
Промывка	4-5 раз 350 мкл
Конъюгат	100 мкл
2 инкубация 45 минут При температуре +37°C±2C	
Промывка	4-5 раз 350 мкл
Раствор ТМБ в субстратном буфере	100 мкл
3 инкубация 20 минут При комнатной температуре	
Стоп-реагент	100 мкл
Измерение оптической плотности при длине волны 450-405 нм и 620-630 нм	

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia
Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443
National Order Entry: +39 06 91.249.702
Export Department: +39 06 91.249.701
Customer Care: +39 06 91.249.700
info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 14. (четырнадцать) лист об

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА D В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА HDVAg

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Вирус Гепатита D (ВГД) – РНК-содержащий дефектный вирус, содержащий коровый антиген (HDAg) и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Этот вирус при репликации нуждается в хелперной функции ВГВ.

ВГД инфекция встречается у пациентов с острым или хроническим Гепатитом В. При одновременном заражении ВГВ и ВГД, заболевание протекает тяжелее, но по клинической картине и биохимическим показателям крови коинфекцию не возможно отличить от Гепатита В. У пациентов с хронической ВГВ инфекцией, репликация ВГД может протекать незаметно, сопровождаясь клинической картиной, похожей на обострение хронического Гепатита В.

Определение специфических серологических маркеров (ВГД антигена или антител к ВГД) очень важно для выявления вируса, вызвавшего инфекцию, и дальнейшего лечения пациента.

Обнаружение в крови специфических антител позволяет определить стадию заболевания и следить за его течением.

Тест-система HDV Ag предназначена для качественного определения антигена ВГД в сыворотке и плазме крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе реагентов реализован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого использованы антитела с различной эпитопной специфичностью к антигену Гепатита D. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках во время первой инкубации, при добавлении исследуемого образца происходит высвобождение антигена из вирусных частиц и его взаимодействие с антителами твердой фазы. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление несвязавшихся компонентов. Во время второй инкубации происходит взаимодействие образовавшегося комплекса «антитело-антиген» с антителами, конъюгированными с пероксидазой. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата, не связавшегося с комплексом. Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству антигена в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках наличие HDVAg оценивается относительно значения cut-off (параметр S/CO позволяет проводить полуколичественное определение антигена).

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
MICROPLATE Микропланшет	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
CONTROL - Отрицательный контроль	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CONTROL + Положительный контроль	2 флакона	Лиофилизированный препарат
CAL Калибровочная проба	2 флакона	Лиофилизированный препарат
WASHBUF 20X 20x Промывочный буфер	1 x 50 мл	Концентрированный раствор Conc.
DILSPE Раствор для разведения образцов	1 x 16 мл	Готов к использованию Ready for use

CONJ Конъюгат	1 x 16 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MICROPLATE) / Microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок). Лунки стрипов планшета покрыты мышинными моноклональными антителами к антигену вируса гепатита D. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

- **Отрицательный контроль (CONTROL -) / Negative Control:** 1 флакон. Раствор бледно-желтого цвета на основе 100 мМ трисового буфера, pH 7,4±0,1, содержит 5% козьего сывороточного альбумина. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.

- **Положительный контроль (CONTROL +) / Positive Control:** 2 флакона. На основе 25 мМ трисового буфера, pH 7,4±0,1, содержит 5% козьего сывороточного альбумина и рекомбинантный антиген вируса гепатита D в высокой концентрации. Лиофилизирован. Консерванты: 0,02% гентамицина сульфат и 0,1% Катон GC. Перед использованием растворить содержимое флакона в 2 мл дистиллированной воды. Восстановленный реагент хранить при -20°C. Повторное замораживание не допускается.

- **Калибратор (CAL) / Calibrator:** 2 флакона. Содержит фетальную бычью сыворотку и рекомбинантный антиген вируса гепатита D в низкой концентрации. Консерванты: 0,02% гентамицина сульфат и 0,1% Катон GC. Лиофилизирован. Перед использованием растворите содержимое флакона в объеме дистиллированной воды, который указан на этикетке. Восстановленный реагент хранить при -20°C. Повторное замораживание не допускается.

Внимание: Объем, необходимый для растворения содержимого флакона, может быть различным для разных партий реагента. Обратите внимание, чтобы препарат был растворен именно в том объеме воды, который указан на этикетке флакона.

- **Промывочный раствор 20x (WASHBUF 20X) / Washing buffer concentrate:** 1 флакон. 1x Промывочный буфер представляет собой 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7,0±0,2, содержащий 0,05% Твин 20 и 0,1% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 7 дней при +2...8°C.

- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон. Раствор красного цвета на основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,8±0,1, содержит поликлональные антитела к антигену вируса гепатита D, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), 5% БСА, 1% мышинной сыворотки, 0,02% гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.

- **Раствор для разведения образцов (DILSPE) / Specimen Diluent:** 1 флакон. Раствор на основе 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4±0,1, содержит 6% NP40. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.

- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.

- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.

- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**

- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая чувствительность и специфичность

Диагностическая чувствительность определялась на панели образцов, которые были определены как положительные референсной Европейской тест-системой. Положительные образцы были получены от пациентов с острой ВГД инфекцией.

Диагностическая специфичность определялась на панели из 250 образцов, полученных от доноров и пациентов, не имеющих иммунитета к ВГА, которые были определены как отрицательные референсной тест-системой.

Не было обнаружено ложноположительных реакций при тестировании анализируемых образцов разных типов.

Не было также обнаружено влияния на специфичность заморозки анализируемых образцов.

Были протестированы образцы пациентов с другими вирусными заболеваниями (ВГС, ВГА) и с гепатитами невирусной природы. Ложноположительных реакций обнаружено не было.

В общей сложности в независимой референсной лаборатории было протестировано более 300 образцов. Диагностическая специфичность составила > 98%. Диагностическая чувствительность составила > 98%.

3.2 Прецизионность

Три образца, с разной концентрацией антигена ВГД, анализировались в трех независимых постановках. В каждой из постановок образцы были нанесены в 16 репликатах. Результаты, полученные при изучении прецизионности трех лотов тест-системы, представлены в нижеследующих таблицах.

Лот № 1102

Отрицательный образец

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,021	0,020	0,019	0,020
Ст. откл.	0,004	0,005	0,004	0,004
КВ, %	17,7	22,7	19,3	19,9

Внутренний Золотой Стандарт (1/8)

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,167	0,166	0,169	0,167
Ст. откл.	0,006	0,008	0,005	0,006
КВ, %	3,9	4,6	3,1	3,9
S/CO	1,3	1,4	1,4	1,4

Внутренний Золотой Стандарт

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	2,416	2,404	2,372	2,397
Ст. откл.	0,150	0,143	0,130	0,141
КВ, %	6,2	5,9	5,5	5,9
S/CO	19,9	20,0	19,9	19,9

Лот № 0103

Отрицательный образец

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,019	0,020	0,018	0,019
Ст. откл.	0,003	0,004	0,003	0,003
КВ, %	17,6	19,4	17,7	18,2

Внутренний Золотой Стандарт (1/8)

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,180	0,180	0,181	0,180
Ст. откл.	0,007	0,008	0,008	0,008
КВ, %	3,8	4,5	4,4	4,3
S/CO	1,5	1,5	1,5	1,5

Внутренний Золотой Стандарт

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	2,415	2,453	2,437	2,435
Ст. откл.	0,135	0,131	0,153	0,140
КВ, %	5,6	5,3	6,3	5,7
S/CO	20,3	20,4	20,7	20,5

Лот № 0403

Отрицательный образец

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,015	0,016	0,015	0,015
Ст. откл.	0,003	0,003	0,003	0,003
КВ, %	17,7	18,8	19,3	18,6

Внутренний Золотой Стандарт (1/8)

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,170	0,169	0,172	0,170
Ст. откл.	0,008	0,008	0,008	0,008
КВ, %	4,8	4,7	4,5	4,7
S/CO	1,5	1,5	1,5	1,5

Внутренний Золотой Стандарт

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	2,378	2,370	2,393	2,380
Ст. откл.	0,103	0,094	0,099	0,099
КВ, %	4,4	4,0	4,1	4,2
S/CO	20,9	20,6	21,0	20,8

Изменения диагнозов образцов обнаружено не было.

3.4 Предел детекции

Международные стандарты для антигена ВГД отсутствуют. Поэтому для определения аналитической чувствительности был приготовлен Внутренний Золотой Стандарт (ВЗС) из образцов пациентов с острой ВГД инфекцией. Предел детекции определялся на трех лотах тест-системы в сравнении с коммерческой Европейской тест-системой. Для этого были приготовлены разведения ВЗС в отрицательной плазме. Результаты определения предела детекции представлены в нижеприведенной таблице.

Разведения ВЗС	Лот № 1102		Лот № 0103		Лот № 0403		DiaSorin
	ОП 450 нм	S/CO	ОП 450 нм	S/CO	ОП 450 нм	S/CO	S/CO
2 К	0,486	4,4	0,539	4,7	0,504	4,7	4,5
4 К	0,266	2,4	0,289	2,5	0,304	2,8	2,6
8 К	0,151	1,4	0,144	1,3	0,163	1,5	1,3
16 К	0,071	0,6	0,078	0,7	0,081	0,8	0,7
Отрицательный контроль	0,011	-	0,015	-	0,008	-	-

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты (см.2.2.1.) разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Мерные цилиндры.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. опт. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

- При заборе венозной крови следует соблюдать правила асептики. Сыворотку или плазму крови получают по общепринятой методике подготовки образцов для лабораторного анализа. Не было обнаружено существенного влияния цитрата, ЭДТА и гепарина на результаты анализа.

- Не допускается добавление в анализируемые образцы консервантов, особенно азида натрия, так как они могут повлиять на ферментативную активность конъюгата и способствовать возникновению ложноотрицательных результатов.

- Образцы должны быть четко маркированы во избежание ошибочной интерпретации результатов. Настоятельно рекомендуется применять штрих-кодирование и электронный датчик для считывания штрих-кода, в особенности, если набор применяется для скрининга донорской крови.

- Не допускается применять образцы с видимыми признаками гемолиза (красный цвет) и липемии («молочный» оттенок), так как при этом может быть получен ложный результат. По этой же причине не допускается применять образцы, содержащие фибрин, твердые частицы или видимые признаки микробной контаминации.

- Сыворотку и плазму допускается хранить при температуре $+2^\circ\text{C}$.. $+8^\circ\text{C}$ в течение 5 суток после сбора. При необходимости более длительного хранения образцы допускается хранить при температуре -20°C в течение нескольких месяцев. Не допускается повторное замораживание/размораживание образцов, так как образовавшиеся при этом включения могут влиять на результат анализа.

- При обнаружении твердых частиц, образцы перед проведением анализа центрифугируют в течение 20 минут при 2000 об/мин, либо очищают фильтрованием (диаметр пор фильтра 0,2-0,8 мкм).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

- Довести реагенты до комнатной температуры ($+18^\circ\text{C}$.. $+25^\circ\text{C}$).

- Тщательно перемешать образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркировать лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставить 1 лунку для обнуления (Blank), 3 лунки для отрицательного контроля, 2 лунки для калибратора и одну лунку для положительного контроля.

7.2. Внести по 100 мкл контролей в соответствующие лунки.

7.3. Внести по 100 мкл анализируемых образцов.

Примечание: Убедитесь, что контроли и образцы были действительно добавлены в лунки.

7.4. Внести во все лунки, кроме лунки А1, по 100 мкл Раствора для разведения образцов. Заклеить планшет клейкой пленкой.

7.5. Инкубировать планшет в течение **120 минут при 37 ± 2 °С**.

7.6. **Примечание:** *Стрипы следует заклеивать специальной пленкой, входящей в состав набора, только в том случае, если анализ проводится вручную. При автоматической постановке анализа клейкая пленка не требуется.*

7.7. Удалить содержимое лунок и с помощью автоматического промывочного устройства промойте микропланшет **4–5 раз** подготовленным к работе Промывочным раствором. При каждой промывке добавляйте по 300 мкл Промывочного раствора в каждую лунку.

7.8. Внесите во все лунки, кроме лунки А1, по 100 мкл Конъюгата. Убедиться, что цвет раствора в лунках с образцами изменился на красный. Заклеить планшет клейкой пленкой.

Примечание: *Во время внесения Конъюгата избегать прикасаться наконечником пипетки к внутренней стороне лунок во избежание контаминации.*

7.9. Инкубировать планшет в течение **60 минут при 37 ± 2 °С**.

Примечание: *Стрипы следует заклеивать специальной пленкой, входящей в состав набора, только в том случае, если анализ проводится вручную. При автоматической постановке анализа клейкая пленка не требуется.*

7.10. Удалить содержимое лунок и с помощью автоматического промывочного устройства промыть микропланшет **4–5 раз** подготовленным к работе Промывочным раствором. При каждой промывке добавлять по 300 мкл Промывочного раствора в каждую лунку.

7.11. Вносить по 100 мкл Раствора ТМБ в каждую лунку, включая А1. Инкубировать планшет **при комнатной температуре ($+18...25$ °С) в течение 20 минут**.

Примечание: *Во избежание высокого фонового сигнала, не допускать попадания света на планшет.*

7.12. Остановить ферментативную реакцию добавлением 100 мкл Стоп-реагента в каждую лунку. Стоп-реагент следует вносить в лунки в той же последовательности, как и Раствор ТМБ. После внесения Стоп-реагента окраска Положительного контроля и положительных образцов изменится с голубой на желтую.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 8.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: *При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.*

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов

Определить среднюю оптическую плотность (ОП) Отрицательного контроля (OK). Рассчитать значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = \text{ОП}_{\text{срOK}} + 0,100$$

Примечание: *Если расчет результатов проводится операционной системой автоматического анализатора, следует убедиться, что задана правильная формула для вычисления значения Cut-off и последующего расчета результатов.*

Присутствие или отсутствие HDVAg определяется путем деления значения ОП образца на Cut-off.

Образцы, для которых при делении на Cut-off получено значение:

- менее 0,9, признают нереактивными (не содержащими HDVAg);
- более 1,1, признают реактивными (содержащими HDVAg);
- 0,9 – 1,1 признают сомнительными.

Отрицательный результат означает, что пациент не был инфицирован вирусом гепатита D.

У всех пациентов с сомнительным результатом следует повторить анализ через 1-2 недели.

Положительный результат анализа указывает на наличие инфекции вирусом гепатита D. Пациент должен получить соответствующую медицинскую помощь.

Примечания:

- *Во избежание ошибок, интерпретацию результатов следует проводить под наблюдением руководителя лаборатории.*

- *Любой положительный результат должен быть подтвержден тестированием образца на другие маркеры ВГД.*

- При сообщении результатов из лаборатории в другие подразделения следует предпринимать меры для исключения ошибок при передаче данных.
- Устанавливать диагноз «вирусный гепатит» и доводить его до сведения пациента должен персонал, имеющий высшее медицинское образование и соответствующую специальную квалификацию.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных.

ОП репликатов Отрицательного контроля (ед.опт.плот.): 0,020 – 0,030 – 0,025
 Среднее значение(ед.опт.плот.): 0,025
 Критерий достоверности(ед.опт.плот.) (< 0,100) Выполняется
 ОП Положительного контроля(ед.опт.плот.): 2,489
 Критерий достоверности (> 1,000) Выполняется
 Cut-Off = 0,025 + 0,100 = 0,125
 ОП репликатов Калибратора (ед.опт.плот.): 0,280 – 0,290
 Среднее значение(ед.опт.плот.): 0,285
 ОП/СО 0,285/0,125 = 2,3
 Отношение ОП/Cut-off > 1,0 Выполняется

ОП Образца 1: 0,030

ОП Образца 2: 1,800

Для Образца 1 ОП/Cut-off < 0,9 Образец считается отрицательным

Для Образца 2 ОП/Cut-off > 1,1 Образец считается положительным

9.2. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, следует убедиться, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям.

Описание	Условие
Blank	< 0,100
Отрицательный контроль	< 0,100; KB < 30%
ОП Калибратора 10МЕ/мл (ВОЗ)	ОП/Cut-off > 1,0
Положительный контроль	> 1,000

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

При несоответствии критериям следует немедленно известить руководство лаборатории. Некоторые возможные причины несоответствия приведены ниже. Перед повторным проведением анализа следует убедиться, что эти причины устранены.

Описание дефекта	Возможная причина
ОП в лунке для обнуления >0,100	Раствор ТМБ был загрязнен в процессе анализа.
ОП Отрицательного контроля >0,100; KB > 30%	1. Не были предварительно подобраны оптимальные параметры промывки и/или настройки промывочного устройства; 2. Использован неподходящий промывочный буфер либо магистрали промывочного устройства не были промыты соответствующим буфером перед началом работы; 3. Ошибка оператора в процессе внесения контролей (положительный контроль вместо отрицательного); 4. Контаминация флакона с Отрицательным контролем, либо лунок, в которые он был внесен, следами положительных образцов или Конъюгата; 5. Загрязнение пипеток следами положительных образцов или Конъюгата; 6. Закупоренные или засоренные иглы автоматического промывочного устройства.
Калибровочная проба: отношение ОП/Cut-off <1,0	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Калибровочной пробы (например, вместо нее внесен Отрицательный контроль); 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Калибровочной пробы
ОП положительного контроля <1,000	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Положительного контроля; 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Положительного контроля.

9.3. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию HDVAg.
- Реактивные образцы признают положительными по содержанию HDVAg.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 3 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Повторяющиеся ложноположительные результаты встречаются в менее, чем 2% случаев и чаще всего связаны с высоким титром НАМА.

Замороженные образцы, содержащие частицы фибрина, способны давать ложноположительные результаты.

СХЕМА АНАЛИЗА

Реагенты \ Лунки	Blank	CONTROL -	CAL	CONTROL +	Образцы
CONTROL -	-----	100 мкл	-----	-----	-----
CAL	-----	-----	100 мкл	-----	-----
CONTROL +	-----	-----	-----	100 мкл	-----
Образцы	-----	-----	-----	-----	100 мкл
DILSPE	-----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл

– Инкубация: 37±2°C, 120 мин.

– Промывка: 4-5 x 300 мкл.

Конъюгат CONJ	-----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
---------------	-------	---------	---------	---------	---------

– Инкубация: 37±2°C, 60 мин.

– Промывка: 4-5 x 300 мкл.

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------	---------

– Инкубация: комнатная температура (+18...25°C), 20 мин.

Стоп-реагент STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм).

Примерная схема нанесения образцов на микропланшет:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	ОБ2										
B	K(-)	ОБ3										
C	K(-)	ОБ4										
D	K(-)	ОБ5										
E	КП	ОБ6										
F	КП	ОБ7										
G	K(+)	ОБ8										
H	ОБ1	ОБ9										

Условные обозначения:

BLK = лунка для обнуления (Blank)

K(-) = отрицательный контроль

КП = калибровочная проба

K(+) = положительный контроль

ОБ – образцы

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 9 (десять) лист об

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
 АНТИТЕЛ К АНТИГЕНУ ВИРУСА ГЕПАТИТА D
 В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
 HDV Ab**

Только для in vitro диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Вирус Гепатита D (ВГД) – РНК содержащий дефектный вирус, содержащий коровый антиген (HDAg) и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Этот вирус при репликации нуждается в хелперной функции ВГВ.

ВГД инфекция встречается у пациентов с острым или хроническим Гепатитом В. При одновременном заражении ВГВ и ВГД, заболевание протекает тяжелее, но по клинической картине и биохимическим показателям крови коинфекцию не возможно отличить от Гепатита В. У пациентов с хронической ВГВ инфекцией, репликация ВГД может протекать незаметно, сопровождаясь клинической картиной, похожей на обострение хронического Гепатита В.

Определение специфических серологических маркеров (ВГД антигена или антител к ВГД) очень важно для выявления вируса, вызвавшего инфекцию, и дальнейшего лечения пациента.

Обнаружение в крови специфических антител позволяет определить стадию заболевания и следить за его течением.

Тест-система HDV Ab предназначена для качественного определения иммуноглобулинов против ВГД в сыворотке и плазме крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе реагентов реализован двустадийный вариант конкурентного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использован рекомбинантный антиген ВГД, который иммобилизован на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок). В лунках, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание специфических антител, содержащихся в исследуемом образце. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время второй инкубации в лунки добавляют специфические антитела, конъюгированные с пероксидазой, которые связывают «свободный» (не связанный антителами исследуемого образца) антиген твердой фазы. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна количеству специфических антител в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках наличие специфических иммуноглобулинов оценивают относительно значения cut-off (параметр S/CO позволяет проводить полуколичественное определение антител).

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
MICROPLATE Микропланшет	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
CONTROL - Отрицательный контроль	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CONTROL + Положительный контроль	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CAL Калибровочная проба	2 флакона	Лиофилизированный препарат
WASHBUF 20X 20x Промывочный буфер	1 x 50 мл	Концентрированный раствор Conc.

CONJ Конъюгат	1 x 16 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Реагенты

- **Иммуносорбент – планшет (MICROPLATE) / Microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок). Лунки стрипов планшета покрыты рекомбинантным антигеном вируса гепатита D. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

- **Отрицательный контроль (CONTROL -) / Negative Control:** 1 флакон. Раствор бледно-желтого цвета на основе 100 мМ трисового буфера, pH 7,4±0,1, содержит белки козьей сыворотки. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.

- **Положительный контроль (CONTROL +) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор зеленого цвета на основе 100 мМ трисового буфера, pH 7,4±0,1, содержит белки козьей сыворотки и антитела к вирусу гепатита D в высокой концентрации. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.

- **Калибратор (CAL) / Calibrator:** 2 флакона. Содержит фетальную бычью сыворотку и антитела человека к ВГД в низкой концентрации. Консерванты: 0,2 мг/мл гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Лиофилизирован. Перед использованием растворите содержимое флакона в объеме дистиллированной воды, указанном на этикетке флакона. Восстановленный реагент хранить при -20°C. Повторное замораживание не допускается.

- **Промывочный раствор 20x (WASHBUF 20X) / Washing buffer concentrate:** 1 флакон. 1x Промывочный буфер представляет собой 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7,0±0,2, содержащий 0,05% Твин 20 и 0,1% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 7 суток при +2...8°C.

- **Конъюгат (CONJ) / Enzyme Conjugate:** 1 флакон. Раствор красного цвета на основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,8±0,1, содержит поликлональные антитела к антигену ВГД, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), 5% БСА, 0,2 мг/мл гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.

- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.

- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.

- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**

- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая чувствительность и специфичность

Клинические испытания набора были проведены на базе Гастро-Гепатологического отделения больницы города Торино, Италия, с участием профессора М. Ризетто и С. Джованни Батиста. Было исследовано более 400 образцов (положительные, отрицательные и содержащие потенциально интерферирующие вещества) в сравнении с референсной Европейской тест-системой.

Не было обнаружено ложноположительных реакций при тестировании анализируемых образцов разных типов.

Диагностическая специфичность составила > 98%. Диагностическая чувствительность составила > 98%.

3.2 Прецизионность

Два образца, с разной концентрацией антител к ВГД, анализировались в трех независимых постановках. В каждой из постановок образцы были нанесены в 16 репликатах. Результаты, полученные при изучении прецизионности трех лотов тест-системы, представлены в нижеследующих таблицах:

Лот № 1102

Отрицательный образец

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	2,342	2,428	2,433	2,401
Ст. откл.	0,113	0,106	0,122	0,114
КВ, %	4,8	4,4	5,0	4,7

Калибратор

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,298	0,289	0,286	0,291
Ст. откл.	0,023	0,027	0,026	0,025
КВ, %	7,7	9,3	9,1	8,7
S/CO	1,6	1,7	1,7	1,7

Лот № 0103

Отрицательный образец

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	2,208	2,237	2,246	2,230
Ст. откл.	0,105	0,108	0,108	0,107
КВ, %	4,7	4,8	4,8	4,8

Калибратор

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,269	0,277	0,266	0,271
Ст. откл.	0,026	0,024	0,025	0,025
КВ, %	9,8	8,5	9,5	9,3
S/CO	1,7	1,7	1,7	1,7

Лот № 0403

Отрицательный образец

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	2,246	2,221	2,182	2,216
Ст. откл.	0,097	0,103	0,118	0,106
КВ, %	4,3	4,6	5,4	4,8

Калибратор

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,286	0,273	0,280	0,280
Ст. откл.	0,027	0,023	0,026	0,025
КВ, %	9,3	8,5	9,1	9,0
S/CO	1,6	1,7	1,6	1,6

Изменения диагнозов образцов обнаружено не было.

3.3 Предел детекции

Международные стандарты для анти-BFDIgM отсутствуют, поэтому этот параметр был определен с помощью контрольного образца, полученного из Boston Biomedica Inc., США (Accurum 127). Были приготовлены разведения контрольного образца в фетальной сыворотке телят. Результаты определения предела детекции представлены в нижеследующей таблице.

Разведения Accurum 127	Лот № 1102		Лот № 0103		Лот № 0403	
	ОП 450 нм	S/CO	ОП 450 нм	S/CO	ОП 450 нм	S/CO
1 x	0,171	3,0	0,163	2,9	0,156	2,8
2 x	0,187	2,7	0,176	2,6	0,179	2,5
4 x	0,230	2,2	0,220	2,1	0,202	2,2
8 x	0,298	1,7	0,285	1,6	0,271	1,6
16 x	0,417	1,2	0,405	1,1	0,402	1,1
32 x	0,514	1,0	0,490	0,9	0,482	0,9
64 x	0,717	0,7	0,700	0,7	0,705	0,6
128 x	1,063	0,5	1,006	0,5	1,015	0,4
Отрицательный контроль	2,484	-	2,261	-	2,114	-

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты разных серий набора (см.п.2.2.1.). Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.

- Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37 \pm 2^\circ\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.
- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.
- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.
- Не разрешается пипетировать ртом.
- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.
- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.
- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.
- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирачный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.
- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.
- Дистиллированная вода.
- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.
- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0–3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Производитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

– При заборе венозной крови следует соблюдать правила асептики. Сыворотку или плазму крови получают по общепринятой методике подготовки образцов для лабораторного анализа. Не было обнаружено существенного влияния цитрата, солей ЭДТА и гепарина на результаты анализа.

– Не допускается добавление в анализируемые образцы консервантов, особенно азида натрия, так как они могут повлиять на ферментативную активность конъюгата и способствовать возникновению ложноотрицательных результатов.

– Образцы должны быть четко маркированы во избежание ошибочной интерпретации результатов. Настоятельно рекомендуется применять штрих-кодирование и электронный датчик для считывания штрих-кода, в особенности если набор применяется для скрининга донорской крови.

– Не допускается применять образцы с видимыми признаками гемолиза (красный цвет) и липемии («молочный» оттенок), так как при этом может быть получен ложный результат. По этой же причине не допускается применять образцы, содержащие фибрин, твердые частицы или видимые признаки микробной контаминации.

– Сыворотку и плазму допускается хранить при температуре $+2^{\circ}\text{C} \dots +8^{\circ}\text{C}$ в течение 5 суток после сбора. При необходимости более длительного хранения образцы допускается хранить при температуре -20°C в течение нескольких месяцев. Не допускается повторное замораживание/размораживание образцов, так как образовавшиеся при этом включения могут влиять на результат анализа.

– При обнаружении твердых частиц, образцы перед проведением анализа центрифугируют в течение 20 минут при 2000 об/мин, либо очищают фильтрованием (диаметр пор фильтра 0,2-0,8 мкм).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры ($+18 \dots +25^{\circ}\text{C}$).

– Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank), 3 лунки для Отрицательного контроля, 2 лунки для калибратора и одну лунку для Положительного контроля.

7.2. Внесите по 100 мкл контролей в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.3. Внесите по 100 мкл анализируемых образцов.

Примечание: Убедитесь, что образцы были действительно добавлены в лунки.

7.4. Инкубируйте планшет в течение 60 минут при $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Примечание: Стрипы следует заклеивать специальной пленкой, входящей в состав набора, только в том случае, если анализ проводится вручную. При автоматической постановке анализа клейкая пленка не требуется.

7.5. Удалите содержимое лунок и с помощью автоматического промывочного устройства промойте микропланшет 4–5 раз подготовленным к работе Промывочным раствором. При каждой промывке добавляйте по 300 мкл Промывочного раствора в каждую лунку.

7.6. Внесите во все лунки, кроме лунки A1, по 100 мкл Конъюгата. Убедитесь, что окрашенный раствор внесен во все необходимые лунки. Заклейте планшет клейкой пленкой.

Примечание: Во время внесения Конъюгата избегайте прикасаться наконечником пипетки к внутренней стороне лунок во избежание контаминации.

7.7. Инкубируйте микропланшет в течение 60 минут при $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

7.8. Удалите содержимое лунок и промойте лунки, как описано в п. 7.5.

7.9. Внесите по 100 мкл Раствора ТМБ в каждую лунку, включая A1. Инкубируйте планшет при комнатной температуре ($+18 \dots +25^{\circ}\text{C}$) в течение 20 минут.

Примечание: Во избежание высокого фонового сигнала, не допускайте попадания света на планшет.

7.10. Остановите ферментативную реакцию добавлением 100 мкл Стоп-реагента в каждую лунку. Стоп-реагент следует вносить в лунки в той же последовательности, как и Раствор ТМБ. После внесения Стоп-реагента окраска Отрицательного контроля и отрицательных образцов изменится с голубой на желтую.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 8.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или EAS для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов

Определите среднюю оптическую плотность (ОП) Отрицательного контроля (ОК). Рассчитайте значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = (\text{ОП}_{\text{срОК}} + \text{ОП}_{\text{ПК}}) / 5 \quad (1)$$

Примечание: Если расчет результатов проводится операционной системой автоматического анализатора, следует убедиться, что задана правильная формула для вычисления значения cut-off и последующего расчета результатов.

Присутствие или отсутствие антител против ВГД определяется путем деления значения Cut-off на ОП образца.

Образцы, для которых при делении Cut-off на ОП образца получено значение:

- менее 0,9- признают нереактивными (не содержащими антитела против ВГЕ);
- более 1,1- признают реактивными (содержащими антитела против ВГЕ);
- 0,9 – 1,1- признают сомнительными.

Отрицательный результат означает, что пациент не был инфицирован ВГД.

У всех пациентов с сомнительным результатом следует повторить анализ через 1-2 недели, получив для этого свежий образец сыворотки или плазмы крови.

Положительный результат анализа указывает на наличие инфицирования ВГД. Пациент должен получить соответствующую медицинскую помощь.

Примечания:

- Во избежание ошибок, интерпретацию результатов следует проводить под наблюдением руководителя лаборатории.
- При сообщении результатов из лаборатории в другие подразделения следует предпринимать меры для исключения ошибок при передаче данных.
- Устанавливать диагноз «вирусный гепатит» и доводить его до сведения пациента должен персонал, имеющий высшее медицинское образование и соответствующую специальную квалификацию.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных данных.

ОП репликатов Отрицательного контроля (ед.опт.плотн.): 2,100 ; 2,200 ; 2,000

Среднее значение ОП ОК (ед.опт.плотн.): 2,100

Критерий достоверности(> 1.000) Выполняется

ОП Положительного контроля (ед.опт.плотн.): 0,100

Критерий достоверности (< ОК/10) Выполняется

Cut-Off = (2,100+0,100) / 5 = 0,440

ОП репликатов Калибратора: 0,300 ; 0,260

Среднее значение (ед.опт.плотн.): 0,280

Отношение ОК/10<ОП_{ср.Калибратора}<ОК/5 Выполняется

ОП Образца 1 (ед.опт.плотн.): 0,020

ОП Образца 2 (ед.опт.плотн.): 1,900

Для Образца 1 Cut-off /ОП > 1,1 - Образец считается положительным

Для Образца 2 Cut-off /ОП < 0,9 - Образец считается отрицательным

9.2. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям:

Описание	Условие
----------	---------

Blank	< 0,100
Отрицательный контроль	> 1,000 (если ОП ОК меньше 1,000 сократите количество промывок или время промывки), КВ < 30%
ОП Калибратора	ОК/10 < ОП ср. калибратора < ОК/5
Положительный контроль	< ОК/10

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

При несоответствии критериям следует немедленно известить руководство лаборатории. Некоторые возможные причины несоответствия приведены ниже. Перед повторным проведением анализа следует убедиться, что эти причины устранены.

Описание дефекта	Возможная причина
ОП в лунке для обнуления >0,100	Раствор ТМБ был загрязнен в процессе анализа.
ОП Отрицательного контроля <1,050; КВ >30%	1. Не были предварительно подобраны оптимальные параметры промывки и/или настройки промывочного устройства; 2. Использован неподходящий промывочный буфер либо магистрали промывочного устройства не были промыты соответствующим буфером перед началом работы; 3. Ошибка оператора в процессе внесения контролей (положительный контроль вместо отрицательного); 4. Контаминация флакона с Отрицательным контролем, либо лунок, в которые он был внесен, следами положительных образцов или Конъюгата; 5. Загрязнение пипеток следами положительных образцов или Конъюгата; 6. Закупоренные или засоренные иглы автоматического промывочного устройства.
Калибровочная проба: ОП не попадает в заданный диапазон	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Калибровочной пробы (например, вместо нее внесен Отрицательный контроль); 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Калибровочной пробы
ОП Положительного контроля >ОК/10	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Положительного контроля; 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Положительного контроля.

9.3. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию антител против ВГД.
- Реактивные образцы признают положительными по содержанию антител против ВГД.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 3 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Бактериальная контаминация и термоинаktivация могут сказаться на оптической плотности образцов, что приведет к неправильному определению уровня аналита.

Тест-система предназначена только для исследования индивидуальных образцов, не следует использовать в качестве анализируемого образца пулы.

Постановка диагноза не должна основываться на единичном лабораторном исследовании, следует принимать во внимание анамнез и результаты исследования другими методами.

СХЕМА АНАЛИЗА

Реагенты	Лунки	Blank	CONTROL -	CAL	CONTROL +	Образцы
CONTROL -		-----	100 мкл	-----	-----	-----
CAL		-----	-----	100 мкл	-----	-----
CONTROL +		-----	-----	-----	100 мкл	-----
Образцы		-----	-----	-----	-----	100 мкл

- Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 60 мин.
- Промывка: 4-5 x 300 мкл.

Конъюгат	CONJ	-----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------	------	-------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 60 мин.
- Промывка: 4-5 x 300 мкл

Раствор ТМБ	TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------	-----	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубация: комнатная температура, 20 мин.

Стоп-реагент	STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------	------	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм).

Примерная схема нанесения образцов на микропланшет:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	ОБ2										
B	K(-)	ОБ3										
C	K(-)	ОБ4										
D	K(-)	ОБ5										
E	КП	ОБ6										
F	КП	ОБ7										
G	K(+)	ОБ8										
H	ОБ1	ОБ9										

Условные обозначения:

BLK = лунка для обнуления (Blank)

K(-) = отрицательный контроль

КП = калибровочная проба

K(+) = положительный контроль

ОБ - образцы

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 8 (восемь) лист об

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М К ВИРУСУ ГЕПАТИТА D В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА HDV IgM

Только для *in vitro* диагностики

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Вирус Гепатита D (ВГД) – РНК-содержащий дефектный вирус, содержащий коровый антиген (HDAg) и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Этот вирус при репликации нуждается в хелперной функции ВГВ.

ВГД инфекция встречается у пациентов с острым или хроническим Гепатитом В. При одновременном заражении ВГВ и ВГД, заболевание протекает тяжелее, но по клинической картине и биохимическим показателям крови коинфекцию невозможно отличить от Гепатита В. У пациентов с хронической ВГВ инфекцией, репликация ВГД может протекать незаметно, сопровождаясь клинической картиной, похожей на обострение хронического Гепатита В.

Определение специфических серологических маркеров (ВГД антигена или антител к ВГД) очень важно для выявления вируса, вызвавшего инфекцию, и дальнейшего лечения пациента.

Обнаружение в крови специфических антител классов М или G позволяет определить стадию заболевания и следить за его течением.

Тест-система HDV IgM предназначена для качественного определения иммуноглобулинов класса М против ВГД в сыворотке и плазме крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В наборе реагентов реализован двустадийный «capture»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Если в образце присутствуют иммуноглобулины класса М, то во время первой инкубации они связываются с антителами, специфичными к IgM человека, которые иммобилизованы на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок). Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Если среди связавшихся IgM присутствуют антитела к соответствующему возбудителю, то во время следующей стадии анализа они связываются с комплексом специфический антиген-антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству специфических IgM в анализируемых пробах. Наличие IgM оценивают относительно значения cut-off.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Количество	Состояние
MICROPLATE Микропланшет	1 x 96 лунок	Готов к использованию Ready for use
CONTROL - Отрицательный контроль	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CONTROL + Положительный контроль	1 x 2,0 мл	Готов к использованию Ready for use
CAL Калибровочная проба	2 флакона	Лиофилизированный препарат
WASHBUF 20X 20x Промывочный буфер	1 x 50 мл	Концентрированный раствор Конс.
CONJ 20X Конъюгат	1 x 0,8 мл	Концентрированный раствор Конс.

Ag HDV Антиген ВГД	6 флаконов	Лиофилизированный препарат
Ag DIL Дилуент для антигена	1 x 16 мл	Готов к использованию Ready for use
DILSPE Раствор для разведения образцов	2 x 50 мл	Готов к использованию Ready for use
Раствор ТМБ TMB	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use
Стоп-реагент STOP	1 x 14 мл	Готов к использованию Ready for use

Количество реагентов рассчитано на 96 лунок.

2.2.1. Реагенты

- **Иммунсорбент – планшет (MICROPLATE) / Microplate:** 1 планшет из 12 разборных стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок). Лунки стрипов планшета покрыты антителами к IgM человека. Неиспользованные стрипы хранить при температуре +2...8°C в плотно закрытом пластиковом пакете (прилагается).

- **Отрицательный контроль (CONTROL -) / Negative Control:** 1 флакон. Раствор бледно-желтого цвета на основе 0,2М трисового буфера, pH 6,0±0,1, содержит антитела человека, не специфичные к вирусу гепатита D, 3% обезжиренное сухое молоко и 0,2% Твин 20. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.

- **Положительный контроль (CONTROL +) / Positive Control:** 1 флакон. Раствор зеленого цвета на основе 0,2М трисового буфера, pH 6,0±0,1, содержит 3% обезжиренное сухое молоко, 0,2% Твин 20 и IgM человека к вирусу гепатита D. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC. Готов к использованию.

- **Калибратор (CAL) / Calibrator:** 2 флакона. Содержит фетальную бычью сыворотку и IgM человека к вирусу гепатита D. Консерванты: 0,2 мг/мл гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Лиофилизован. Перед использованием растворите содержимое флакона в объеме дистиллированной воды, который указан на этикетке. Восстановленный реагент хранить при -20°C. Повторное замораживание не допускается.

- **Промывочный раствор 20x (WASHBUF 20X) / Washing buffer concentrate:** 1 флакон. 1x Промывочный буфер представляет собой 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7,0±0,2, содержащий 0,05% Твин 20 и 0,05% Катон GC. Перед использованием развести необходимое количество концентрата дистиллированной водой в соотношении 1:20. В случае образования нерастворимых кристаллов поместите раствор в термостат (+37°C) на несколько минут. Приготовленный промывочный раствор хранить не более 7 суток при +2...8°C.

- **Конъюгат 20x (CONJ) / Enzyme Conjugate 20x:** 1 флакон. Раствор на основе 10 мМ трисового буфера, pH 6,8±0,1, содержит поликлональные антитела к вирусу гепатита D, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), 5% БСА, 0,02% гентамицина сульфата и 0,1% Катон GC. Используется для приготовления иммунокомплекса. Готов к использованию.

- **Антиген ВГД (Ag HDV) / HDV Antigen:** 6 флаконов. Содержит 25 мМ трисовый буфер, pH 7,8±0,1, 5% сыворотки человека и рекомбинантный антиген вируса гепатита D. Лиофилизован. Используется для приготовления иммунокомплекса.

- **Дилуент для антигена ВГД (Ag DIL) / HDV Antigen Diluent:** 1 флакон. Красный раствор на основе 0,2 М трисового буфера, pH 6,0±0,1, содержит 0,1% Катон GC и 0,2% Тритон X100. Используется для восстановления антигена ВГД.

Внимание: Готовить иммунокомплекс нужно только после начала первой инкубации. Добавить во флакон с лиофилизированным антигеном 2 мл Дилуента для антигена, аккуратно перемешать. Когда антиген полностью растворится добавить во флакон 100 мкл 20x концентрата конъюгата. Полученный иммунокомплекс хранить при -20°C. Повторное замораживание не допускается.

- **Раствор для разведения образцов (DILSPE) / Specimen Diluent:** 2 флакона. Раствор голубого цвета на основе 0,2 М трисового буфера, pH 6,0±0,1, содержащий 3% обезжиренное сухое молоко и 0,2% Твин 20. Готов к использованию. Консерванты: 0,09% азид натрия и 0,1% Катон GC.

- **Раствор ТМБ (TMB):** 1 флакон. Раствор тетраметилбензидина в цитратно-фосфатном буфере, содержащем DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.

- **Стоп-реагент (STOP) / Blocking Reagent:** 1 флакон. 1N HCl. Готов к использованию.

- **Бумага для заклеивания планшета (CPA) / Adhesive plate sealers.**

- **Пластиковый пакет.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Диагностическая чувствительность и специфичность

Клинические испытания набора были проведены на базе Гастро-Гепатологического отделения больницы города Торино, Италия, с участием профессора М. Ризетто и С. Джованни Батиста. Было исследовано более 400 образцов в сравнении с референсной Европейской тест-системой.

Положительные образцы были получены от пациентов с ВГD инфекцией

Диагностическая специфичность определялась на панели из 250 образцов, полученных от доноров и пациентов, не имеющих иммунитета к ВГD, которые были определены как отрицательные референтной тест-системой.

Не было обнаружено ложноположительных реакций при тестировании анализируемых образцов разных типов.

Не было также обнаружено влияния на специфичность заморозки анализируемых образцов.

Были протестированы образцы пациентов с другими вирусными заболеваниями (ВГС, ВГА) и с гепатитами невирусной природы. Ложноположительных реакций обнаружено не было.

В общей сложности в независимых референсных лабораториях было протестировано более 300 образцов. Диагностическая специфичность составила > 98%. Диагностическая чувствительность составила > 98%.

3.2 Прецизионность

Три образца, с разной концентрацией IgM к ВГD, анализировались в трех независимых постановках. В каждой из постановок образцы были нанесены в 16 репликатах. Результаты, полученные при изучении прецизионности трех лотов тест-системы, представлены в нижеследующих таблицах.

Лот № 1102

Отрицательный образец

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,061	0,056	0,056	0,058
Ст. откл.	0,008	0,007	0,007	0,008
KB, %	13,9	13,0	12,9	13,3

Калибратор

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,796	0,810	0,802	0,803
Ст. откл.	0,044	0,041	0,046	0,044
KB, %	5,5	5,1	5,7	5,4
S/CO	2,6	2,6	2,6	2,6

Положительный контроль

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	2,133	2,143	2,134	2,137
Ст. откл.	0,081	0,081	0,095	0,086
KB, %	3,8	3,8	4,4	4,0
S/CO	6,9	7,0	7,0	7,0

Лот № 0103

Отрицательный образец

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,062	0,059	0,066	0,062
Ст. откл.	0,008	0,005	0,006	0,006
KB, %	12,4	9,3	9,2	10,3

Калибратор

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,843	0,843	0,826	0,837
Ст. откл.	0,051	0,051	0,045	0,049
KB, %	6,0	6,0	5,4	5,8
S/CO	2,7	2,7	2,7	2,7

Положительный контроль

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	2,299	2,278	2,227	2,268
Ст. откл.	0,115	0,102	0,112	0,110
KB, %	5,0	4,5	5,0	4,8
S/CO	7,4	7,4	7,0	7,3

Лот № 0403

Отрицательный образец

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,066	0,070	0,067	0,068
Ст. откл.	0,006	0,008	0,008	0,007
KB, %	9,8	10,7	11,3	10,6

Калибратор

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	0,800	0,813	0,815	0,809
Ст. откл.	0,044	0,046	0,049	0,046
KB, %	5,5	5,7	6,0	5,7
S/CO	2,5	2,5	2,6	2,5

Положительный контроль

	Постановка 1	Постановка 2	Постановка 3	Среднее
ОП, 450 нм, ед.опт.пл	2,352	2,328	2,339	2,340
Ст. откл.	0,093	0,098	0,105	0,099
KB, %	3,9	4,2	4,5	4,2
S/CO	7,5	7,3	7,4	7,4

Изменения диагнозов образцов обнаружено не было.

3.3 Предел детекции

Международные стандарты для анти-ВГDIgM отсутствуют. Поэтому для определения аналитической чувствительности был приготовлен Внутренний Золотой Стандарт (ВЗС) из образцов пациентов с острой ВГД инфекцией. Предел детекции определялся на трех лотах тест-системы в сравнении с коммерческой Европейской тест-системой. Для этого были приготовлены разведения ВЗС в отрицательной плазме. Результаты определения предела детекции представлены в нижеследующей таблице.

Разведения ВЗС	Лот № 1102		Лот № 0103		Лот № 0403		DiaSorin
	ОП 450 нм	S/CO	ОП 450 нм	S/CO	ОП 450 нм	S/CO	S/CO
1 x	0,728	2,5	0,783	2,6	0,837	2,7	2,6
2 x	0,443	1,5	0,461	1,5	0,471	1,5	1,4
4 x	0,286	1,0	0,281	0,9	0,305	1,0	1,0
8 x	0,154	0,5	0,160	0,5	0,185	0,6	0,5
Плазма	0,039	0,1	0,054	0,2	0,065	0,2	0,2

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты (см.2.2.1.) разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Разрешается смешивать Промывочный раствор, Раствор ТМБ и Стоп-реагент разных серий набора. Не смешивайте их с реагентами других производителей.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не храните реагенты при высоких температурах и/или в местах, где возможно их загрязнение.
- Используйте только чистую стеклянную посуду. Избегайте присутствия ионов металлов или окислителей.
- Используйте только дистиллированную или деионизованную воду. Храните воду только в чистой посуде.
- Избегайте контаминации образцов. Используйте одноразовые наконечники для каждого образца или реагента.
- Не вносите никаких изменений в «Схему анализа». Несоблюдение временного интервала и температуры инкубации, а также объемов вносимых реагентов может привести к неправильным результатам анализа.
- Растворение лиофилизированных компонентов проводите в соответствии с указаниями на соответствующей этикетке. Любое отклонение может привести к неправильным результатам анализа.
- В случае проведения анализа вручную необходимо использовать откалиброванные автоматические пипетки и обращать особое внимание на точность внесения реагентов. Следует убедиться, что все применяемое оборудование (микропипетки, промывочное устройство, спектрофотометр, термостат) проходит регулярную проверку и поддерживается в исправном состоянии.
- Убедитесь в исправности насоса, который используется для удаления жидкости из лунок или автоматического промывочного устройства для планшетов. Недостаточная промывка лунок может привести к неверной интерпретации результатов анализа.
- Убедитесь в исправности спектрофотометра. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или загрязненные светофильтры могут привести к неверному определению оптической плотности образцов и последующим неправильным результатам анализа.
- Убедитесь в исправности термостата, если его применение требуется в «Схеме анализа». Если температура инкубации отклоняется от $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, это может привести к снижению чувствительности анализа и/или биологической денатурации образцов и реагентов. Следует периодически проверять показания датчика температуры.

- Убедитесь в исправности холодильного оборудования для хранения реагентов и/или образцов. Несоблюдение температурного режима хранения может привести к биологической денатурации компонентов. Периодически проверяйте показания датчика температуры.

- Следует обеспечить надежную идентификацию образцов пациентов. Неверная идентификация может привести к ложным результатам и постановке ошибочного клинического диагноза.

Чтобы исключить заражение персонала и загрязнение окружающей среды, следует соблюдать следующие правила:

- При работе с потенциально инфекционным материалом и во время проведения анализа следует надевать одноразовые защитные перчатки.

- Не разрешается пипетировать ртом.

- Не разрешается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

- Следует соблюдать осторожность в обращении с Раствором ТМБ и Стоп-реагентом. Избегать попадания в глаза, на кожу и слизистые. В случае контакта тщательно промыть пораженный участок проточной водой.

- Компоненты набора, полученные из сыворотки крови человека, были проверены на присутствие HBsAg, антител к ВИЧ и к вирусу гепатита С. Несмотря на полученные отрицательные результаты, следует учесть, что ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полное отсутствие указанных вирусов. По этой причине все образцы и другие реагенты, содержащие сыворотку крови человека, следует считать потенциально инфекционными.

- Следует избегать разбрызгивания реагентов и образования аэрозолей. Места, на которые попал пролитый материал, следует тщательно обработать 3% раствором гипохлорита натрия. Использованный при этом протирочный материал следует считать потенциально инфицированным и подвергнуть соответствующей обработке перед утилизацией.

- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Чтобы исключить накопление взрывоопасных азидов металлов в чугунных и медных водопроводных трубах, после слива использованных реагентов следует промыть сток большим объемом проточной воды.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

5.1. Материалы и оборудование, необходимые при ручной постановке анализа

- Микропипетки, в том числе многоканальные, высокой точности (10-200 мкл, менее 3% ошибки) со сменными наконечниками.

- Градуированные цилиндры для разведения реагентов.

- Дистиллированная вода.

- Термостат, позволяющий инкубировать микропланшеты при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

- Автоматическое промывочное устройство для микропланшетов или насос для удаления содержимого из лунок.

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках в диапазоне 0-3 ед. оп. плотн. при длинах волн 620, 450 и 405 нм.

5.2. Автоматическое проведение анализа

Изготовитель гарантирует возможность применения данного набора для проведения анализа на автоматических анализаторах открытого типа производства компании RADIM и/или SEAC.

В случае использования автоматических анализаторов других фирм, пользователю необходимо удостовериться, что конкретный анализатор позволяет применять наборы реагентов для иммуноферментного анализа производства RADIM.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

- При заборе венозной крови следует соблюдать правила асептики. Сыворотку или плазму крови получают по общепринятой методике подготовки образцов для лабораторного анализа. Не было обнаружено существенного влияния цитрата, солей ЭДТА и гепарина на результаты анализа.

- Не допускается добавление в анализируемые образцы консервантов, особенно азиды натрия, так как они могут повлиять на ферментативную активность конъюгата и способствовать возникновению ложноотрицательных результатов.

- Образцы должны быть четко маркированы во избежание ошибочной интерпретации результатов. Настоятельно рекомендуется применять штрих-кодирование и электронный датчик для считывания штрих-кода, в особенности, если набор применяется для скрининга донорской крови.

- Не допускается применять образцы с видимыми признаками гемолиза (красный цвет) и липемии («молочный» оттенок), так как при этом может быть получен ложный результат. По этой же причине не допускается применять образцы, содержащие фибрин, твердые частицы или видимые признаки микробной контаминации.

- Сыворотку и плазму допускается хранить при температуре $+2^\circ\text{C} \dots +8^\circ\text{C}$ в течение 5 суток после сбора. При необходимости более длительного хранения образцы допускается хранить при температуре -20°C в течение нескольких месяцев. Не допускается повторное замораживание/размораживание образцов, так как образовавшиеся при этом включения могут влиять на результат анализа.

– При обнаружении твердых частиц, образцы перед проведением анализа центрифугируют в течение 20 минут при 2000 об/мин, либо очищают фильтрованием (диаметр пор фильтра 0,2-0,8 мкм).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА*

– Доведите реагенты до комнатной температуры (+18...25°C).

– Тщательно перемешайте образцы перед проведением анализа.

7.1. Разведите анализируемые образцы 1:200 (например, 1000 мкл Раствора для разведения образцов + 5 мкл образца).

7.2. Промаркируйте лунки для контролей и исследуемых образцов. Оставьте 1 лунку для обнуления (Blank), 3 лунки для отрицательного контроля, 2 лунки для калибратора и одну лунку для положительного контроля.

7.3. Внесите по 100 мкл контролей в соответствующие лунки.

Внимание: Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

7.4. Внесите по 100 мкл разведенных анализируемых образцов.

Примечание: Убедитесь, что образцы и контроли были действительно добавлены в лунки.

7.5. Инкубируйте планшет в течение 60 минут при 37±2°C.

Примечание: Стрипы следует заклеивать специальной пленкой, входящей в состав набора, только в том случае, если анализ проводится вручную. При автоматической постановке анализа клейкая пленка не требуется.

7.6. За 5-10 минут до окончания первой инкубации приготовьте иммунокомплекс (Антиген ВГА-Антитела, конъюгированные с пероксидазой) как описано в пункте 2.2.

7.7. Удалите содержимое лунок и с помощью автоматического промывочного устройства промойте микропланшет 4–5 раз подготовленным к работе Промывочным раствором. При каждой промывке добавляйте по 350 мкл Промывочного раствора в каждую лунку.

7.8. Внесите во все лунки, кроме лунки А1, по 100 мкл иммунокомплекса. Заклейте планшет клейкой пленкой.

Примечание: Во время внесения Конъюгата избегайте прикасаться наконечником пипетки к внутренней стороне лунок во избежание контаминации.

7.9. Инкубируйте микропланшет в течение 60 минут при +37±2°C.

7.10. Удалите содержимое лунок и промойте лунки, как описано в п. 7.7.

7.11. Внесите по 100 мкл Раствора ТМБ в каждую лунку, включая А1. Инкубируйте планшет при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 20 минут.

Примечание: Во избежание высокого фонового сигнала, не допускайте попадания света на планшет.

7.12. Остановите ферментативную реакцию добавлением 100 мкл Стоп-реагента в каждую лунку. Стоп-реагент следует вносить в лунки в той же последовательности, как и Раствор ТМБ. После внесения Стоп-реагента окраска Положительного контроля и положительных образцов изменится с голубой на желтую.

СХЕМА АНАЛИЗА приведена на странице 8.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливается на 620 нм. При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунке Blank из значений оптических плотностей всех остальных лунок. В случае, если значение ОП превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение должно проводиться не позже, чем через 15 минут после остановки реакции.

Примечание: При использовании автоматических анализаторов производства RADIM и/или SEAC для планшетного формата (microplates) считывающий спектрофотометр должен измерять значения автоматически на 3 длинах волн: 450, 405 и 620 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов

Определить среднюю оптическую плотность (ОП) Отрицательного контроля (OK). Рассчитать значение Cut-off по формуле (1):

$$\text{Cut-off} = \text{ОП}_{\text{срOK}} + 0,250$$

Примечание: Если расчет результатов проводится операционной системой автоматического анализатора, следует убедиться, что задана правильная формула для вычисления значения Cut-off и последующего расчета результатов.

Присутствие или отсутствие IgM против ВГД определяется путем деления ОП образца на значение Cut-off.

Образцы, для которых при делении на Cut-off получено значение менее 0,9 признают нереактивными (не содержащими IgM против ВГД).

Образцы, для которых при делении на Cut-off получено значение более 1,1, признают реактивными (содержащими IgM против ВГД). Пациент должен получить соответствующую медицинскую помощь.

Область 0,9 – 1,1, является областью сомнительных значений. Если ОП образца попадает в эти пределы, результат считается сомнительным. Следует повторить анализ через 1-2 недели, получив для него свежий образец сыворотки или плазмы.

Примечания:

- Во избежание ошибок, интерпретацию результатов следует проводить под наблюдением руководителя лаборатории.
- При сообщении результатов из лаборатории в другие подразделения следует предпринимать меры для исключения ошибок при передаче данных.
- Устанавливать диагноз «вирусный гепатит» и доводить его до сведения пациента должен персонал, имеющий высшее медицинское образование и соответствующую специальную квалификацию.

Пример расчета результатов:

Запрещается использовать приведенные ниже значения вместо реальных экспериментальных.

ОП репликатов Отрицательного контроля (ед.опт.плот.): 0,100 – 0,120 – 0,080
Среднее значение (ед.опт.плот.): 0,100
Критерий достоверности (< 0,200) Выполняется
ОП Положительного контроля (ед.опт.плот.): 2,000
Критерий достоверности (> 0,900) Выполняется
Cut-Off = 0,100 + 0,250 = 0,350
ОП репликатов Калибратора: 1,000 – 1,100
Среднее значение (ед.опт.плот.): 1,050
Отношение ОП/Cut-off = 3,0
Критерий достоверности (отношение > 2,5 ед.опт.плот.) Выполняется
ОП Образца 1: 0,080
ОП Образца 2: 1,800
Для Образца 1 ОП/Cut-off < 0,9 Образец считается отрицательным
Для Образца 2 ОП/Cut-off > 1,1 Образец считается положительным

9.2. Критерии достоверности

Прежде чем начать обсчет результатов, убедитесь, что ОП контрольных точек соответствуют следующим критериям.

Описание	Условие
Blank	< 0,100
Отрицательный контроль	< 0,200; КВ < 30%
ОП Калибратора/Cut-off	> 2,5
Положительный контроль	> 0,900

Если полученные значения не соответствуют условиям, необходимо повторить анализ.

При несоответствии критериям следует немедленно известить руководство лаборатории. Некоторые возможные причины несоответствия приведены ниже. Перед повторным проведением анализа следует убедиться, что эти причины устранены.

Описание дефекта	Возможная причина
ОП в лунке для обнуления >0,100	Раствор ТМБ был загрязнен в процессе анализа.
ОП Отрицательного контроля > 0,200; КВ > 30%	1. Не были предварительно подобраны оптимальные параметры промывки и/или настройки промывочного устройства; 2. Использован неподходящий промывочный буфер либо магистрали промывочного устройства не были промыты соответствующим буфером перед началом работы; 3. Ошибка оператора в процессе внесения контролей (положительный контроль вместо отрицательного); 4. Контаминация флакона с Отрицательным контролем, либо лунок, в которые он был внесен, следами положительных образцов или Конъюгата; 5. Загрязнение пипеток следами положительных образцов или Конъюгата; 6. Закупоренные или засоренные иглы автоматического промывочного устройства.
Калибровочная проба: отношение ОП/ Cut-off < 2,5	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Калибровочной пробы (например, вместо нее внесен Отрицательный контроль); 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Калибровочной пробы
ОП положительного контроля < 0,900	1. Нарушена последовательность выполнения анализа; 2. Ошибка оператора при нанесении Положительного контроля; 3. Параметры промывки или настройки промывочного устройства отличаются от предварительно выбранных оптимальных значений; 4. Контаминация Положительного контроля.

9.3. Интерпретация результатов

- Нереактивные образцы признают отрицательными по содержанию IgM против ВГД.
- Реактивные и сомнительные образцы признают положительными по содержанию IgM против ВГД.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

- Набор должен храниться при температуре +2...8°C.
- Срок годности реагентов указан на этикетках флаконов.
- Вскрытые реагенты стабильны при температуре +2...8°C в течение 3 месяцев.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ АНАЛИЗА

Получение ложноположительных результатов возможно в менее 2% случаев и связано с высокой концентрацией ревматоидного фактора.

Замороженные образцы, содержащие фибрин, после разморозки могут давать ложные результаты.

СХЕМА АНАЛИЗА

Реагенты \ Лунки	Blank	CONTROL -	CAL	CONTROL +	Образцы (разведенные в 200 раз)
CONTROL -	-----	100 мкл	-----	-----	-----
CAL	-----	-----	100 мкл	-----	-----
CONTROL +	-----	-----	-----	100 мкл	-----
Образцы (разведенные в 200 раз)	-----	-----	-----	-----	100 мкл

Инкубация: 37±2°C, 60 мин.

* Промывка: 4-5 x 350 мкл.

Иммунокомплекс	-----	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------	-------	---------	---------	---------	---------

* Инкубация: 37±2°C, 60 мин.

* Промывка: 4-5 x 350 мкл

Раствор ТМБ TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------------	---------	---------	---------	---------	---------

* Инкубация: комнатная температура (+18...25°C), 20 мин.

топ-реагент STOP		100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------------	--	---------	---------	---------	---------	---------

Считывание: 450-405 нм (референсная длина волны: 620 нм).

Примерная схема нанесения образцов на микропланшет:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	ОБ2										
B	K(-)	ОБ3										
C	K(-)	ОБ4										
D	K(-)	ОБ5										
E	КП	ОБ6										
F	КП	ОБ7										
G	K(+)	ОБ8										
H	ОБ1	ОБ9										

Условные обозначения:

BLK = лунка для обнуления (Blank)

K(-) = отрицательный контроль

K(+) = положительный контроль

ОБ - образцы

неральный директор
ОО «Компания Алкор Био»

ководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ОО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Сусорова А.С.



RADIM S.p.A. - Via del Mare, 125 - 00040 Pomezia (Roma) Italia

Tel.: +39 06 91.249.1 - Fax: +39 06 91.249.443

National Order Entry: +39 06 91.249.702

Export Department: +39 06 91.249.701

Customer Care: +39 06 91.249.700

info@radim.it - www.radim.it



RADIM

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 1 (двумь) лист об

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев

