

«УТВЕРЖДЕН»

Генеральный директор
ООО «Медико-Диагностическая
Лаборатория»



Чиркова Е.Ю.

2011 г

**ИНСТРУКЦИЯ по применению
ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

**Наборы реагентов диагностических
для иммунологических исследований in vitro**

Соответствуют требованиям национальных и международных стандартов
ГОСТ Р 51088-97

NovaTec Adenovirus IgA- ELISA
Кат. № ADVA0010



1. НАЗНАЧЕНИЕ:

Набор предназначен для полуколичественного определения антител класса IgA против Adenovirus IgA в сыворотке крови человека.

Принцип

Исследуемые образцы помещают в микролунки, покрытые антигеном. Антитела в образце связывают антиген, покрывающий поверхность микролунки. Несвязавшийся материал удаляют промыванием. Затем в микролунки добавляют вторые антитела против IgA человека, меченные ферментом пероксидазой. После последующего промывания определяют активность фермента, оставшегося связанным на поверхности лунки, путем добавления хромоген-субстратной смеси, затем стоп-реагента и фотометрии при 450 нм. Оптическая плотность образца в лунках прямо пропорционально связана с количеством специфических антител в образце.

2. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТАРИЙ.

2.1 Реагенты, вошедшие в состав набора.

- **Микропланшеты**, покрытые антигеном Adenovirus: 12 разборных 8-луночных стрипов, герметично упакованных в фольгу.
- **IgA Разбавитель образцов** 1 флакон содержит 100 мл раствора pH 7.2 ± 0.2 ; желтая окраска; готов для использования; белая крышка.
- **Стоп-реагент**: 1 флакон содержит 15 мл серной кислоты, 0.2 моль/л. Готов для использования; красная крышка.
- **Концентрат моющего раствора** (конц. $\times 20$): 1 флакон содержит 50 мл Фосфатного буфера pH 7.2 ± 0.2 ; Твин-20; белая крышка.
- **Adenovirus анти-IgA Конъюгат**: 1 флакон содержит 20 мл раствора кроличьих антител к IgA человека меченных пероксидазой; фиолетового цвета; готов для использования; черная крышка.
- **ТМВ-субстрат**. 1 флакон содержит 15 мл готового для использования раствора. Желтая крышка.
- **Adenovirus IgA Положительный контроль**: 1 флакон, содержащий 2 мл раствора желтого цвета, готового к использованию; красная крышка.
- **Adenovirus IgA Cut-off контроль**: 1 флакон, содержащий 3 мл раствора желтого цвета, готового к использованию; зеленая крышка.
- **Adenovirus IgA Отрицательный контроль**: 1 флакон, содержащий 2 мл раствора желтого цвета, готового к использованию; синяя крышка.

2.2 Материалы:

- 1 держатель для стрипов
- 2 фольги для закрывания планшетов
- 1 инструкция
- 1 схема планшета

ООО «Медико-Диагностическая Лаборатория»

123098 Москва, ул. Гамалеи, 16

Тел./факс: (499) 190-30-47

E-mail: meddialab@mtu-net.ru www.meddialab.ru

2.3 Дополнительные необходимые материалы и оборудование:

- Ридер для измерения абсорбции при 450/620 нм.
- Инкубатор (37°C)
- Ручное или автоматическое устройство для промывания лунок
- Автоматические пипетки с объемом от 10 до 1000 мкл
- Вортекс для перемешивания пробирок
- Деионизированная или дистиллированная (свежая) вода
- Одноразовые пробирки
- Таймер

3. СТАБИЛЬНОСТЬ И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты стабильны до окончания срока годности, указанного на этикетке, при условии хранения при температуре 2...8°C.

4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Внимание! Перед выполнением анализа все реагенты, пробы и контроли должны быть нагреты до комнатной температуры (20 - 25 °C).

4.1 СТРИПЫ

Готовые для использования планшеты покрыты антигеном Adenovirus. Хранить при температуре 2...8°C. Планшеты находятся в герметичной вакуумной упаковке. *Сразу после отделения стрипов оставшиеся необходимо тщательно закрыть прилагающейся к набору алюминиевой фольгой и хранить при температуре 2...8 °C до истечения срока годности.*

4.2 Adenovirus анти-IgA конъюгат

Флакон содержит 20 мл раствора кроличьих антител к IgA человека меченных пероксидазой хрена, буфер, стабилизаторы, консерванты и инертный фиолетовый краситель; готов для использования. Хранить при температуре 2...8°C. *Открытые реагенты стабильны до окончания срока годности, если хранятся при 2...8°C.*

4.3 Контроль

Флаконы с положительным, Cut-off и отрицательным контролями содержат готовые для использования контрольные реагенты. Они должны храниться при температуре 2...8°C. *Открытые реагенты стабильны до окончания срока годности, если хранятся при 2...8°C.*

4.4 IgA Разбавитель образцов

Флакон содержит 100 мл фосфатного буфера, стабилизаторы, консерванты и инертный желтый краситель. Используется для разбавления образца и конъюгата. Реагенты готовы для использования и должны храниться при температуре 2...8°C. *Открытые реагенты стабильны до окончания срока годности, если хранятся при 2...8°C.*

4.5 Концентрат моющего раствора

Флакон содержит 50 мл концентрированного буфера, детергентов, стабилизаторов и консервантов. Разведите моющий раствор 1+19; т.е. 10 мл моющего раствора + 190 мл дистиллированной воды. Разбавленный буфер хранится в течение 5 дней при комнатной температуре. *Кристаллы в растворе исчезают при нагреве до 37 °C в водяной бане. Открытый концентрат стабилен до истечения срока годности.*

4.6 Раствор ТМВ

Флакон содержит 15 мл раствора. Реагент готов для использования и должен храниться при температуре 2...8°C в темноте. Реагент бесцветен, допускается слабый голубоватый оттенок. Синяя окраска раствора свидетельствует о его возможном загрязнении, такой раствор не должен быть использован. Открытый флакон хранить до окончания срока годности при температуре 2...8°C.

4.7 Стоп-реагент

Флакон содержит 15 мл 0.2 М серной кислоты. Реагент готов для использования и должен храниться при температуре 2...8°C. Открытый флакон хранить до окончания срока годности.

5. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для анализа используются образцы сыворотки крови или плазмы пациента. Если анализ будет производиться не позднее 5 дней после сбора проб, то их следует хранить при температуре 2...8°C; в противном случае они должны быть разделены на аликвоты и глубоко заморожены (-70 ... -20°C). Если пробы были заморожены, перемешайте их перед анализом. Избегайте повторного замораживания и оттаивания.

5.1 Разведение образцов

Перед работой необходимо развести пробы в соотношении 1+100 IgA- Разбавителем образцов. Внесите 10 мкл образца и 1 мл IgA-Разбавителя в пробирки хорошо перемешайте при помощи вортекса. Положительный и отрицательный контроль готовы к использованию и не подлежат разведению.

6. ВЫПОЛНЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1. Подготовка к работе

Пожалуйста, внимательно прочтите инструкцию перед проведением анализа, от этого зависит достоверность результатов! При использовании автоматического анализатора увеличьте кол-во промывок до 5. Отломите необходимое количество стрипов и поместите в держатель.

Пожалуйста, назначьте, по крайней мере:

- | | | |
|---------|---------|------------------------------|
| 1 лунку | (A1) | для субстратного бланка, |
| 1 лунку | (B1) | для отрицательного контроля, |
| 2 лунки | (C1+D1) | для cut-off контроля, |
| 1 лунку | (E1) | для положительного контроля. |

Рекомендуется определять стандарты и образцы в дубликаты.

Все этапы процедуры проводите в данном порядке и без значительных перерывов.

Для каждого контроля и образца должны использоваться чистые одноразовые наконечники.

Установите температуру в инкубаторе $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

1. Внесите 100 мкл соответствующего контроля или образца в нужные лунки. Оставьте лунку A1 для субстратного бланка.
2. Закройте лунки фольгой, прилагающейся к набору.
3. Инкубируйте в течение 1 часа $\pm$ 5 минут при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
4. Когда время инкубации подошло к концу, удалите фольгу, аспирируйте содержимое лунок и промойте каждую лунку 3 раза 300 мкл моющего раствора. Избегайте переливания

раствора через края лунок. Промывать лунки необходимо с интервалом >5 секунд. Осторожно удалите остатки жидкости фильтровальной бумагой, прежде чем приступить к следующему шагу. *Замечание: Этот этап очень важен! Недостаточно тщательное промывание ведет к снижению точности и неверным значениям оптических плотностей.*

5. Внесите 100 мкл Конъюгата в каждую лунку, кроме A1. Закройте фольгой.

6. **Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре**

Не подвержайте воздействию прямых солнечных лучей.

7. Повторите действия пункта 4.

8. Добавьте 100 мкл субстратного раствора ТМВ во все лунки

9. **Инкубируйте ровно 15 минут при комнатной температуре в темноте.**

10. Добавьте 100мкл стоп-реагента в каждую лунку в том порядке и с теми интервалами, с которыми был добавлен субстрат ТМВ.

Во время инкубации все синие оттенки становятся желтыми.

Замечание: Высоко положительные образцы могут давать темный осадок хромогена! Это может повлиять на считывание оптической плотности. Рекомендуем развести такие образцы физраствором, например, в соотношении 1+1. Затем развести в соотношении 1+100 IgA Разбавителем образцов и результат в Ед. умножить на 2.

11. Не позднее 30 минут после добавления стоп-реагента измерьте поглощение при 450/620 нм.

6.2 Измерение

Установите ридер на ноль при помощи субстратного бланка в лунке A1.

Если – по техническим причинам - ридер не устанавливается на ноль при помощи субстратного бланка в лунке A1, необходимо вычесть оптическую плотность раствора в лунке A1 из всех измеренных оптических плотностей!

Измеряйте поглощение во всех лунках при 450 нм и записывайте оптическую плотность для каждого контроля и образца

Рекомендуется использовать длину волны 620 нм как референтную.

6. РЕЗУЛЬТАТЫ

6.1. Критерии правильности проведения анализа

Для оценки правильности проведения анализа используются следующие критерии::

- | | | |
|--------------------------|----------|--|
| ■ Субстратный бланк | A1: | Оптическая плотность < 0.100. |
| ■ Отрицательный контроль | B1: | Оптическая плотность < 0.200 и < cut-off |
| ■ Cut-off контроль | C1 и D1: | Оптическая плотность 0.150 - 1.30. |
| ■ Положительный контроль | E1: | Оптическая плотность > cut-off. |

Если эти критерии не соответствуют, тест не действителен и должен быть повторен.

6.2. Вычисления

Вычислите среднее арифметическое для Cut-off контроля:

Например: оптическая плотность контроля Cut-off 0.39 + оптическая плотность контроля Cut-off 0.37 = $0.76 / 2 = 0.38$

$$\text{Cut-off} = 0.38$$

6.3. Интерпретация результатов,

Образцы считаются **положительными** если оптическая плотность более чем на 10% выше чем cut-off.

Образцы, оптическая плотность которых на 10% выше или ниже чем cut-off не могут быть четко отнесены к положительным или отрицательным и попадают в серую зону.

Для данных образцов рекомендуется повторить тест спустя 2 - 4 недели со свежей пробой. Если результаты второго теста снова в «серой зоне», то этот образец считается **отрицательным**

Образцы считаются **отрицательными**, если оптическая плотность более чем на 10% ниже чем величина cut-off.

6.3.1. Результаты в единицах NovaTec Units

Оптическая плотность образца (средняя) $\times 10$ = [NovaTec-Units = NTU]
Cut-off

Например: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-off :	10	NTU
Серая зона:	9-11	NTU
Отрицательный:	<9	NTU
Положительный:	>11	NTU

7. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ

7.1. Специфичность >90%

7.3. Чувствительность >90%

7.4. Ограничения анализа.

Бактериальное загрязнение или повторное замораживание и оттаивание образцов могут повлиять на результаты. Диагностика инфекционного заболевания не может быть произведена на основании результатов одного анализа. Точный диагноз устанавливается с учетом истории болезни, симптоматики и показателей сыворотки крови.

8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Все компоненты, содержащие биоматериал человека, проверены и не содержат антител к HCV, HBsAg и HIV. Однако, следует обращаться с ними как с потенциально инфицированными.
- Не смешивайте реагенты и стрипы разных наборов.
- Не используйте в этом анализе реагенты других производителей.
- Не используйте набор по истечению указанного в маркировке срока использования.
- Используйте только чистые наконечники и лабораторную посуду.
- Не путайте крышки флаконов.
- Сразу же после использования плотно закрывайте реагенты во избежание испарения и микробной контаминации.
- После первого вскрытия и последующего хранения реагентов перед употреблением проверяйте, чтобы в конъюгате и контролях не было бактериального пророста.

СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ Adenovirus IgA

Подготовка к работе

Готовить реагенты и образцы по инструкции (см. раздел ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ).

Выберите необходимое количество микропланшетных полосок или лунок и поместите их в штатив.

Проведение анализа

	Субстратный Бланк (e.g. A1)	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Cut-off контроль	Образец (разведение 1+100)
Отрицательный контроль	-	100 мкл	-	-	-
Положительный контроль	-	-	100 мкл	-	-
Cut-off контроль	-	-	-	100 мкл	-
Образец (разведение 1+100)	-	-	-	-	100 мкл
Накройте лунки фольгой, прилагающейся к набору Инкубируйте в течение одного часа при температуре 37°C Промойте трижды каждую лунку 300 мкл моющего раствора					
Конъюгат	-	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Накройте лунки фольгой, прилагающейся к набору Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре Промойте трижды каждую лунку 300 мкл моющего раствора					
TMB Субстрат	100мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте ровно 15 минут в темноте при комнатной температуре					
Стоп-реагент	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Фотометрическое измерение при 450 нм (дополнительная длина волны: 620 нм)					

При работе на автоматических анализаторах увеличить количество промывок до 5 .

Всего прошнуровано и скреплено печатью
7 (семь) листов

Генеральный директор
Чиркова Е.Ю.

