

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"



В.Ю. Борисов
2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Тест-система иммуноферментная для выявления
иммуноглобулинов класса G к возбудителю токсокароза»
"ИФА-Токсокароз-IgG"

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к возбудителю токсокароза» "ИФА-Токсокароз-IgG" предназначен для качественного и полуколичественного выявления иммуноглобулинов класса G к возбудителю токсокароза в сыворотке (плазме) крови человека методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Функциональное назначение: вспомогательное средство в диагностике.

Применение изделия не имеет популяционных и демографических аспектов.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики in vitro.

Показания и противопоказания к применению изделия

Показания: in vitro диагностика инвазии токсокарами.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Токсокароз – гельминтоз из группы нематодозов, семейства Anisakidae, вызывающий инвазию у представителей семейства псовых и кошачьих. Заражение человека происходит фекально-оральным путем.

Заболевание проявляется двумя основными формами: висцеральной и глазной.

Токсокароз характеризуется длительным течением и частыми рецидивами.

Определение антител класса IgG к возбудителю токсокароза – это основной серологический метод, позволяющий диагностировать инвазию токсокарами.

Выявление антител класса G к антигенам токсокар может быть использовано для:

- диагностики токсокароза у лиц с характерным комплексом симптомов (лимфаденопатия, гепатомегалия, бронхит и бронхиальная астма неясного генеза, уртикарная сыпь) на фоне эозинофилии крови и лейкомоидной реакции эозинофильного типа, характерным эпидемиологическим анамнезом (геофагия; виды деятельности, предполагающие контакт с землей);
- дифференциальной диагностики токсокароза от других гельминтозов и заболеваний, сопровождающихся выраженной эозинофилией;
- оценки эффективности лечения токсокароза;
- эпидемиологических исследований.

Рекомендуется обследование людей, относящихся к группам риска: ветеринаров, животноводов, кинологов, детей с признаками лихорадки неясного происхождения и с эозинофилией крови.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	очищенные и инаktivированные антигены токсокары, сорбированные на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном	1 планшет
	<i>допускается раздельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)</i>	
Контрольный положительный образец (K ⁺)	инаktivированный; сыворотка крови человека, содержащая иммуноглобулины класса G к возбудителю токсокароза; прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость	1 фл. (1,5 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	инаktivированный; сыворотка крови человека, не содержащая иммуноглобулины класса G возбудителю токсокароза; прозрачная или слегка опалесцирующая желтого цвета жидкость	1 фл. (2,5 мл)
Конъюгат	моноклональные мышинные антитела против иммуноглобулинов человека класса G, конъюгированные с пероксидазой хрена; прозрачная или опалесцирующая зеленого цвета жидкость	1 фл. (12 мл)
Раствор индикаторный (РИ);	прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость	1 фл. (12 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	прозрачная или слегка опалесцирующая фиолетового цвета жидкость	1 фл. (12 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °C в течение 30 мин	1 фл. (40 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (12,5 мл)
Одноразовые наконечники для автоматических пипеток		16 шт.

Примечания. 1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(x25), РИ, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование неспецифических реагентов из разных серий.

3. K⁺ и K⁻ не содержат HBsAg, антитела к ВГС, ВИЧ-1,2.

4. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

5. В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Набор дополнительно укомплектован:

вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),

клейкой пленкой для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации набора позволяет исследование 96 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 3 лунки).

Предусмотрена возможность проведения раздельных исследований, с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Число иссл. образцов	1-6	6-13	7-21	22-29	30-37	38-45	46-53	54-61	62-69	70-77	78-85	86-93

Методы стерилизации изделия

Изделие не требует стерилизации.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемом образце иммуноглобулинов класса G к токсокаре происходит связывание их с антигеном токсокары, сорбированным в лунках планшета-иммуносорбента, образовавшийся комплекс антиген-антитело реагирует с внесенным в реакционную среду раствором конъюгата – антителами против IgG человека, меченными пероксидазой хрена. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело-конъюгат" выявляется в реакции с субстратно-индикаторным раствором, содержащим хромоген – тетраметилбензидин, в результате которой меняется цвет (оптическая плотность) реакционной смеси в лунке планшета; изменение регистрируется спектрофотометрически.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность набора определяется по стандартной панели положительных сывороток предприятия, содержащих иммуноглобулины класса G возбудителю токсокароза, (СОП⁺-207), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность набора определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, не содержащих иммуноглобулины класса G возбудителю токсокароза, (СОП⁻-207) как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 99,58 - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови: 98,48% - 100%;

Плазма крови: 99,43% - 100%;

Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,77 - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови: 99,51% - 100%;

Плазма крови: 99,57% - 100%;

Воспроизводимость результатов составила 100%.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Нативная сыворотка (плазма с ЭДТА, с гепарином, с цитратом натрия) крови человека объемом не менее 10 мкл.

Сбор образцов крови должен производиться в соответствии с надлежащей практикой методом венепункции (ГОСТ Р 53079.4-2008 «Обеспечение качества клинических лабораторных исследований»).

Образцы до исследования можно хранить при температуре от 2 до 8 °С. При необходимости хранения образцов более 7 дней рекомендуется разделить их на аликвоты и хранить при температуре от минус 20 до минус 70 °С. Размороженные образцы перед исследованием нужно тщательно перемешать. При работе с размороженными образцами следует учитывать, что каждый цикл оттаивания - замораживания приводит к разрушению антител, снижая качество исследуемого материала. С целью получения достоверных результатов исследования рекомендуется использовать только однократное замораживание – оттаивание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов (и/или) с признаками гемолиза, и (и/или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

Перекрестных реакций, обусловленных наличием общих антигенных детерминант в гельминтах (с аскаридозом, трихинеллезом, эхинококкозом, лямблиозом и токсокарозом) при постановке испытуемого набора не выявлено.

При исследовании образцов с содержанием до 200 г/л гемоглобина, 120 мкмоль/л билирубина и 11 ммоль/л триглицеридов интерференция не наблюдалась.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2 б (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.), ГОСТ 31508.

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил "Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений" (Утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003).

РРО содержит азид натрия в безопасной концентрации. Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" относится к классу А - отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными и классу Б (эпидемиологически опасные отходы) – инфицированные и потенциально инфицированные отходы, материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

Перечень рисков, идентифицированных в процессе анализа риска, и описание способов управления этими рисками в целях снижения их до допустимого уровня представлен отдельным документом.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

"РУЧНАЯ" ПОСТАНОВКА

Оборудование и материалы

- Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми;
- Мерный цилиндр (стакан) вместимостью 1000 мл для приготовления отмывающего раствора.
- Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета;
- Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм;
- Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин;

- Холодильник бытовой;
- Фильтровальная бумага;
- Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная);
- 70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлор-содержащих.
- ИФА-анализатор.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

В зависимости от числа используемых стрипов отобрать необходимый объем концентрата и довести его водой очищенной до объема, указанного в табл. 1

Таблица 1

Реагент	Объем реагента, мл, настрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т(х25)	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очи- щенная	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 190 сут, при температуре от 18 до 25 °С – не более 30 суток.

Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, К⁺, К⁻, РРО, конъюгат, РИ, стоп-реагент – готовы к применению.

Проведение ИФА ("ручная" постановка).

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из пакета планшет, вскрыв выше замка «zip-lock», и установить на рамку необходимое для проведения ИФА количество стрипов. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник. Хранение вскрытого иммуносорбента возможно при температуре 2-8°С до истечения срока годности набора.

2. Внести в три лунки контрольные образцы (в одну лунку – 100 мкл К⁺, в две лунки – по 100 мкл К⁻); в остальные лунки внести по 100 мкл РРО. Затем в лунки с РРО внести по 10 мкл исследуемых образцов; содержимое лунок перемешать пипетированием (при этом цвет РРО должен измениться).

Примечание. При постановке ИФА на одном стрипе допускается использовать по 1 лунке на каждый контрольный образец.

3. Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой. Инкубировать 30 мин при температуре 37°С в защищенном от света месте.

4. По окончании инкубации аспирировать содержимое лунок и промыть лунки планшета 5 раз ФСБ-Т, внося в лунки 350-370 мкл раствора. При наличии промывателя, позволяющего производить промывку в режиме "Overflow", использовать именно этот режим. По окончании промывки остатки раствора удалить из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

5. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата, выдержать 30 мин при температуре 37°С в защищенном от света месте.

6. С помощью промывателя удалить жидкость из лунок, 5 раз промыть планшет как указано в п.5.

7. Во все лунки внести по 100 мкл раствора индикаторного, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и выдержать 15 мин при температуре от 37°С.

8. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился субстратно-индикаторный раствор) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содер-

Экстракция и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм ОП измерять при длине волны 450 нм; а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитываются только при следующих условиях:

среднее значение ОП для (K^+) – не менее 0,5;

среднее значение ОП для (K^-) – не более 0,15 (при использовании 1 стрипа - единичное значение ОП(K^-) - не более 0,15).

В противном случае исследование необходимо повторить.

Рассчитать критическое значение оптической плотности, $ОП_{крит.}$, по формуле

$$ОП_{крит.} = ОП_{K^-_{ср}} + 0,2$$

где $ОП_{K^-_{ср}}$ – среднее значение ОП в лунках с K^- (при использовании 1 стрипа - значение ОП в лунке с K^-);

0,2 – коэффициент, полученный экспериментальным путем.

При $ОП_{иссл.обр}$ больше $1,2 \times ОП_{крит.}$ образец считается положительным и содержащим иммуноглобулины к токсокаре.

При $ОП_{иссл.обр}$ меньше $0,9 \times ОП_{крит.}$ образец считается отрицательным, т.е. не содержащим иммуноглобулины к токсокаре.

При $ОП_{иссл.обр}$ в интервале от $0,9 \times ОП_{крит.}$ до $1,2 \times ОП_{крит.}$ образец считается сомнительным; исследование такого образца рекомендуется повторить.

Интерпретацию результатов анализа проводит лечащий врач с учетом клинических признаков и результатов прямых методов анализа (дуоденальное зондирование, копроовоскопия).

Следует учитывать возможность перекрестных серологических реакций при заболеваниях описторхозом, трихинеллезом, аскаридозом и эхинококкозом. Это может быть связано как с совместной инвазией, так и с взаимодействием антител с гетерологичными антигенами за счет наличия общих антигенных компонентов.

Титрование положительного образца

Тест-система позволяет выполнить определение титра антител в выявленном положительном образце. Для этого, на отдельном стрипе необходимо провести ИФА с соответствующим образцом в последовательных двукратных разведениях его раствором РРО от 1:10 до 1:1280.

Для приготовления указанных разведений в верхнюю лунку стрипа внести 180 мкл раствора РРО, в остальные лунки стрипа – по 100 мкл раствора РРО. Затем в верхнюю лунку стрипа внести 20 мкл выявленного положительного образца, тщательно перемешать пипетированием и перенести 100 мкл полученного разведения (1:10) во вторую лунку, тщательно перемешать пипетированием, перенести 100 мкл полученного разведения (1:20) в третью лунку и так – до последней лунки стрипа. Из последней лунки стрипа отобрать 100 мкл разведения (1:1280) и слить его в дезинфицирующий раствор.

Далее провести ИФА как указано в п. **Проведение ИФА ("ручная" постановка).**

Диагностическим титром анализируемого образца сыворотки (плазмы) крови следует считать наибольшее разведение анализируемого образца, при котором его оптическая плотность больше либо равна величине критического значения оптической плотности ($ОП_{иссл.обр.} \geq ОП_{крит.}$)

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Замораживание не допускается!

Хранение

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Транспортирование

Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течении 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к возбудителю токсокароза» "ИФА-Токсокароз-IgG", соответствует ТУ 21.20.23.110-207-70423725-2020, Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности.

По вопросам, касающимся качества и обращения набора "ИФА-Токсокароз-IgG", следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. 8 (49643) 3-23-11, 3-30-93, тел/факс 8(49643) 3-30-85, 8 (800) 333-33-47.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе

С.Г. Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

П.К. Варнавичус

«12» 03 2021 г.



КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА ("ИФА-Токсокарор-IgG")

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести	в три лунки контрольные образцы (в одну лунку – 100 мкл К ⁺ , в две лунки – по 100 мкл К ⁻ ; –; при использовании 1 стрипа: в одну лунку – 100 мкл К ⁺ и в одну лунку – по 100 мкл К ⁻); в остальные лунки внести по 100 мкл РРО. Затем в лунки с РРО внести по 10 мкл исследуемых образцов
Инкубация	30 мин, 37 °С
Промыть	5 раз промывочным раствором
Внести	по 100 мкл конъюгата в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 37 °С
Промыть	5 раз промывочным раствором
Внести	по 100 мкл индикаторного раствора в каждую лунку
Инкубация	15 мин, 37°С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по воздуху.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА УПАКОВКЕ И ЭТИКЕТКАХ

IVD	Только для диагностики <i>in vitro</i>
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Биологический риск
	Хранить при температуре

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ
«23» 03 2021 год
Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
лист 06
Ген. Директор ЗАО "ЭКОлаб"
Борисов В.Ю.
"ЭКОлаб" 2021 г.