"УТВЕРЖДАЮ"
Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"

_____ В.Ю.Борисов
"14" февраля 2014 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
«Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G
к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр»
«ИФА-Эпштейн-Барр-IgG»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр» «ИФА-Эпштейн-Барр-IgG» предназначен для выявления и определения титра иммуноглобулинов класса G к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр (ВЭБ) в сыворотке и плазме крови человека методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	лизатный инактивированный очищенный капсидный антиген ВЭБ, сорбированный на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном (используются "ломающиеся" стрипы)	1 планшет
Контрольный положительный образец ($\mathbf{K^+}$)	инактивированный; содержит иммуноглобулины класса G к к капсидному антигену ВЭБ в титре 1:500; прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный образец уровня "среза" ($\mathbf{K^+_{пов}}$)	инактивированный; содержит иммуноглобулины класса G к капсидному антигену ВЭБ в "пороговом" титре (1:100); прозрачная жидкость желтого цвета	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный отрицательный образец ($\mathbf{K^-}$)	инактивированный; прозрачная жидкость зеленого цвета	1 фл. (1,2 мл)
Конъюгат	антитела моноклональные мышиные против иммуноглобулинов человека класса G, меченые пероксидазой хрена; прозрачная розового цвета жидкость	1 фл. (13 мл)
Раствор для предварительного разведения образцов (**РПРО**)	прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (15 мл)
Раствор для разведения образцов (**РРО**)	прозрачная жидкость синего цвета	1 фл. (15 мл)
25-кратный концентрат промывочного раствора [**ПР(х25)**]	прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 ^{0}С в течение 30 мин	2 фл. (по 40 мл)
Раствор индикаторный (**РИ**);	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (12,5 мл)

Примечания. 1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.
2. ПР(х25), РИ, РРО, РПРО, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты.

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Принадлежности:

вспомогательным планшетом для предварительного разведения образцов (1 шт.),
вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),
одноразовыми наконечниками для автоматических пипеток (16 шт.)
клейкой пленкой для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению и бланк калибровочного графика.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набор выпускается в одном базовом варианте комплектации.

Базовый вариант комплектации набора позволяет одномоментное исследование 96 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется от 3 до 6 лунок, одна лунка – для определения уровня "бланк"). Предусмотрена возможность проведения раздельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Лунок для контр.	4	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Число иссл. обр.	1-4	5-9	10-17	18-25	26-33	34-41	42-49	50-57	58-65	66-73	74-81	82-89

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемом образце иммуноглобулинов класса G к капсидному антигену ВЭБ происходит связывание их с капсидным антигеном ВЭБ, сорбированным в лунках планшета-иммуносорбента, образовавшийся комплекс антиген-антитело реагирует с внесенным в реакционную среду раствором конъюгата – антителами к IgG человека, мечеными пероксидазой. 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.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Нативная сыворотка (плазма) крови человека объемом не менее 10 мкл.

Образцы сыворотки (плазмы) крови до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С и 3 мес при температуре минус 20 °С или более низкой. Допускается только однократное замораживание-размораживание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

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

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность (минимальный титр IgG-антител к ВЭБ, выявляемый с помощью набора)– 1:100.

Чувствительность определяется по стандартной панели положительных сывороток предприятия, (СОП$^{+}$-211), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, (СОП$^{-}$-211) как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Диагностическая чувствительность

Статистическая достоверность результатов диагностической чувствительности испытаний составила:

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Заключение	Общее число клинических образцов с истинно положительными результатами анализа (n)	Негативный результат	Позитивный результат	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%)
Положительных по иммуноглобулинам класса G к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр	1100	0	1100	99,73% - 100%

Статистическая достоверность диагностической чувствительности для каждого вида биологического материала составила:

Вид клинического материала	Количество образцов от пациентов		Общее количество образцов от пациентов	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%), не менее %
	При проведении основных клинических испытаний	При проведении дополнительных клинических испытаний		
Сыворотки, содержащие иммуноглобулины класса G к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр	480	50	530	99,44%
Образцы плазмы, содержащие иммуноглобулины класса G к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр	510	60	570	99,48%

Диагностическая чувствительность для клинических образцов составила:

Клинический материал	Заключение	Результаты испытаний
		Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%)
Сыворотка крови	Выявлены иммуноглобулины класса G к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр	99,44% - 100%
Плазма крови	Выявлены иммуноглобулины класса G к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр	99,48% - 100%

Диагностическая специфичность

Статистическая достоверность результатов диагностической специфичности испытаний составила:

Заключение	Общее число клинических образцов с истинно отрицательными результатами анализа (n)	Негативный результат	Позитивный результат	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Отрицательных по иммуноглобулинам класса G к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр	990	990	0	99,70% - 100%

Статистическая достоверность диагностической специфичности для каждого вида биологического материала составила:

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Вид клинического материала	Количество образцов от пациентов		Общее количество образцов от пациентов	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%), не менее %
	При проведении основных клинических испытаний	При проведении дополнительных клинических испытаний		
Сыворотки, не содержащие иммуноглобулины класса G к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр	480	0	480	99,38
Образцы плазмы, не содержащие иммуноглобулины класса G к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр	510	0	510	99,41

Диагностическая специфичность для клинических образцов составила:

Клинический материал	Заключение	Результаты испытаний
		Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%)
Сыворотка крови	Не выявлены иммуноглобулины класса G к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр	99,38% - 100%
Плазма крови	Не выявлены иммуноглобулины класса G к капсидному антигену вируса Эпштейн-Барр	99,41% - 100%

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

РРО, РПРО содержат натрия азид в конечной концентрации 0,01 %. Данная концентрация является безопасной [1]

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 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» относится к классу А - отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными. Класс А – эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам (ТБО).

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

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 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» относится к классу А - отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными

[1] ПДКв = 0,05 мг/л (по азид-иону) http://toxi.dyndns.org/base/nonorganic/Nitrogenium1/Azid_natrija.htm

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

больными. Класс А – эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам (ТБО).

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы (для "ручной" постановки)

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.

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, термостат на 37 °С, 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 хлорсодержащих.

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 (ПР)

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

При постановках с использованием ИФА-анализаторов 80 мл ПР(х25) довести водой очищенной до 2 л.

При дробной "ручной" постановке использовать соотношения объемов ПР(х25) и воды, указанные в табл. 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1

Число стрипов	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ПР(х25), мл	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищенная, мл	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 14 сут.

Предварительное разведение исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести 1:10 во вспомогательном планшете. Для этого внести в его лунки по 90 мкл РПРО и добавить по 10 мкл сыворотки, тщательно перемешать пипетированием. При этом розовый цвет должен измениться на желтый. Если изменение цвета не произошло, данный образец необходимо исследовать повторно с целью исключения неправильных результатов. Рабочее разведение (1:100) готовить непосредственно в лунках иммуносорбента (см. раздел **Проведение ИФА ("ручная" постановка),** п. 2).

Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, $К^+$, $К^-$, $К^+_{пор}$, РРО, РПРО, конъюгат, РИ, стоп-реагент – готовы к применению.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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 упаковки рамку планшета и необходимое число стрипов. Неиспользованные стрипы допускается хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

2. В лунку А1 внести 100 мкл РРО, в следующие лунки внести по 100 мкл контрольных образцов (по 2 лунки на каждый контрольный образец), оставшиеся лунки использовать для исследуемых образцов (по 1 лунке на образец), для чего внести в них: вначале по 90 мкл РРО, а затем – по 10 мкл образцов, предварительно разведенных 1:10 в лунках вспомогательного планшета (см. раздел *«Предварительное разведение исследуемых образцов»*), тщательно перемешать пипетированием.

3. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой, инкубировать 30 мин при температуре от 21 до 25^{0}С в защищенном от света месте.

4. С помощью промывателя удалить содержимое лунок, 4 раза промыть планшет промывочным раствором, 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 планшета внести по 100 мкл конъюгата.

6. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой, инкубировать 30 мин при температуре от 21 до 25^{0}С в защищенном от света месте.

7. С помощью промывателя удалить содержимое лунок, 4 раза промыть планшет как указано в п. 4.

8. Во все лунки внести по 100 мкл раствора индикаторного, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и инкубировать 10–15 мин при температуре от 21 до 25^{0}С.

9. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился раствор индикаторный) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и не более чем через 10 мин приступить к учету результатов.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по лунке А1. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм.

Результаты ИФА учитывать при следующих условиях:

среднее значение $ОП_{К}^{+}$ – не менее 0,60;

среднее значение $ОП_{К}^{+}{}_{пор}$ – не менее 0,20;

отношение среднего значения $ОП_{К}^{+}$ к среднему значению $ОП_{К}^{+}{}_{пор}$ – не менее 1,5;

среднее значение $ОП_{К}^{-}$ – не более 0,10.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Качественный учет результатов

Исследуемые образцы учитывать:

как положительные при $ОП_{обр} > 1{,}1 \times ОП_{К}^{+}{}_{пор}$;

как отрицательные при $ОП_{обр} < 0{,}9 \times ОП_{К}^{+}{}_{пор}$.

Образцы с $ОП_{обр}$, равной $ОП_{К}^{+}{}_{пор}$ или отличающейся от $ОП_{К}^{+}{}_{пор}$ не более чем на 10 %, рекомендуется исследовать повторно; при повторении "сомнительного" результата необходимо дополнительное обследование пациента.

Полуколичественный учет результатов (определение титра)

Для полуколичественного учета результатов (титр антител класса G в исследуемых сыворотках) строится калибровочный график, для чего на стандартном бланке по оси абсцисс (полулогарифмическая шкала) откладываются значения титров $К^{+}$ и $К^{+}{}_{пор}$, а по оси ординат (пропорциональная шкала) – соответствующие им средние значения ОП, полученные в ИФА. Точки

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

соединяются прямой. Для оценки активности исследуемого образца на калибровочном графике находится точка, ордината которой равна полученному в ИФА с этим образцом значению ОП; абсцисса этой точки будет равна титру антител класса G в образце.

Если ОП образца превышает $ОП_К^+$, рекомендуется повторить анализ образца в большем разведении; полученное при этом по графику значение титра умножить на величину дополнительного разведения.

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

Хранение

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

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

Транспортирование

При температуре от 2 °С до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 °С до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

По вопросам, касающимся качества и обращения набора "ИФА-Эпштейн-Барр-IgG", следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе С.Г.Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» П.К. Варнавичус

«14» 02 2017 г.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

КРАТКАЯ СХЕМА ИФА
(ИФА-Эпштейн-Барр-IgG)

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в лунку А1– 100 мкл РРО, в лунки В1, С1- по 100 мкл $К^+$, в лунки D1, Е1-по 100 мкл $К^+_{пор}$ в лунки F1,G1 –по 100 мкл К-, в остальные лунки – вначале по 90 мкл РРО, а затем – по 10 мкл образцов, предварительно разведенных 1:10 в лунках вспомогательного планшета (см. раздел *«Предварительное разведение исследуемых образцов»*)
Инкубация	30 мин, 21-25 °С
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	во все лунки по 100 мкл конъюгата
Инкубация	30 мин, 21-25 °С
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	по 100 мкл раствора индикаторного в каждую лунку
Инкубация	10-15 мин, 21-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по лунке А1

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ

«14» 02 2017 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К. _____

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
8 лист об
Начальник ОНД ЗАО "ЭКОлаб"
_____ Гашенко Т.Ю.
"14" 02 2017 г.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU