«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«26» 05 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к грибам рода Candida в сыворотке (плазме) крови

(Кандида-IgG-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Кандида-IgG-ИФА-БЕСТ (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к грибам рода Candida в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Выявление иммуноглобулинов класса G к грибам рода Candida может быть использовано для диагностики кандидоза различной локализации в совокупности с результатами культуральной диагностики и клиникой заболевания, а также дифференциальной диагностики смешанных инфекций, вызванных грибами Candida и бактериями.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализов в дублях 45 неизвестных, 3 контрольных образцов, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения иммуноглобулинов класса G к грибам рода Candida представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сывороток (плазмы) крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами Candida albicans происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-антитело» на поверхности лунок. После добавления в лунки планшета конъюгата моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс.

Комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к грибам рода Candida в анализируемом образце сыворотки (плазмы) крови.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антигенами Candida albicans, готовый для использования – 1 шт.;

– положительный контрольный образец ($К^+$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий иммуноглобулины класса G к грибам рода Candida, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);

– отрицательный контрольный образец ($К^–$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий иммуноглобулины класса G к грибам рода Candida, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);

– конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);

– раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10 мл);

– раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

– пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;

– ванночкой для реагента – 2 шт.;

– наконечниками для пипетки на 5-200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

– планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфическая активность:

чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам грибов рода Candida – соответствие результатов качественного выявления набором иммуноглобулинов класса G к антигенам грибов рода Candida требованиям стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-283), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с положительными сыворотками №1-№16 больше либо равны величине диагностического значения оптической плотности ($ОП_{№1-№16} \geq ОП_д$);

специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам грибов рода Candida – соответствие результатов качественного выявления набором иммуноглобулинов класса G к антигенам грибов рода Candida требованиям стандартной панели предприятия СПП (рег.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

№ 05-2-284), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с отрицательными сыворотками №1-№16 меньше либо равны величине диагностического значения оптической плотности, умноженного на 0,85 ($ОП_{№1-№16} \leq 0,85 \times ОП_{д}$).

3.2. Титр стандартного образца предприятия $СОП^{+}$ (рег. № 05-2-13) должен быть не менее 1:800.

3.3. Диагностическая чувствительность: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 80 положительных образцах, взятых у больных с подтвержденным кандидозом, показали 93% чувствительность (интервал 86%-97% , с доверительной вероятностью 90%).

3.4. Диагностическая специфичность: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 46 отрицательных образцах, взятых у доноров, отобранных случайным образом, и больных с иной нозологией (токсокароз, туберкулез, аспергилез, токсоплазмоз) показали 91% специфичность (интервал 81%-97%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаний МУ-287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998 г).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционного, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в по-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

мещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2, деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;

– термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 до 300 мкл;

– перчатки резиновые хирургические;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– флаконы стеклянные вместимостью 10-15 мл;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;

– колба вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови допускается хранить при температуре от 2 до

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8 °С не более 5 сут при отсутствии микробной контаминации или при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 3 мес.

Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты набора и образцы сывороток (плазмы) крови при температуре от 18 до 25 °С не менее 60 мин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимые для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление рабочего буферного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

Приготовленный рабочий буферный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного ($К^+$) и отрицательного ($К^-$) контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Положительный и отрицательный контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.5. Предварительное разведение исследуемых образцов.

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать. При разведении сыворотки крас-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

Предварительно разведенные исследуемые образцы можно хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч.

7.6. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор конъюгата утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента поместить в защищенное от света место.

Оставшийся после проведения ИФА раствор тетраметилбензидина утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).

Раствор ТМБ после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Количество используемых стрипов	Рабочий буферный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
1	2,0	до 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Количество используемых стрипов	Рабочий буферный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

7.9. Внесение образцов.

В лунку А-1 внести 100 мкл положительного контрольного образца ($К^+$). В лунки В-1 и С-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца ($К^-$).

В остальные лунки внести в дублях по 90 мкл рабочего буферного раствора (см п. 7.3) и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови (см п. 7.5), перемешать пипетированием.

7.10. Определение титра исследуемых образцов.

Для определения титра в выявленных положительных образцах в лунки горизонтального ряда А внести по 180 мкл рабочего буферного раствора (см п. 7.3) и по 20 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сывороток (плазмы) крови (см п. 7.5). В лунки рядов В-Н внести по 100 мкл рабочего буферного раствора. Каждый образец титровать, перенося по 100 мкл раствора из лунок предыдущего ряда в лунки последующего от А до Н, тщательно перемешивая пипетированием. После растительной из каждой лунки последнего ряда Н удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором по 100 мкл раствора, оставляя в лунках по 100 мкл. Таким образом, в вертикальных рядах получаются последовательные 2-кратные разведения исследуемых образцов в интервале от 1:100 до 1:12800.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин.

7.11. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре (37±1) °С.

7.12. По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 400 мкл рабочего буферного раствора (см п. 7.3). Процесс промывки повторить еще 4 раза. Общее количество отмывок равно 5. Время между

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.14. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре (37 ± 1) °С.

7.15. По окончании инкубации промыть планшет как описано в п. 7.12.

7.16. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

Планшет инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.17. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620-655 нм. Допускается измерение оптической плотности при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху).

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом, для каждой пары лунок, содержащих образцы исследуемых сывороток (плазмы) и последовательные разведения исследуемых сывороток (плазмы) крови.

9.2. На основании полученных данных вычислить диагностическое значение оптической плотности ($ОП_д$) по формуле:

$$ОП_д = ОП_{ср} (К^-) + 0,22,$$

где: $ОП_{ср} (К^-)$ – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с от-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

рицательным контрольным образцом, ед. опт. плотн.

9.3. Оценка результатов:

– среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,25 ед. опт. плотн.;

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,80 ед. опт. плотн.

9.4. Только при соблюдении положений п. 9.3. можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9. 5. Результат анализа считают положительным, если $ОП_{обр} \geq ОП_{д}$.

Результаты анализа считают отрицательным, если $ОП_{обр} \leq 0{,}85\times ОП_{д}$.

Результаты анализа считают сомнительными, если $ОП_{д} > ОП_{обр} > 0{,}85\times ОП_{д}$,

где: $ОП_{обр}$ – оптическая плотность анализируемого образца в лунке, ед. опт. плотн.

При получении сомнительного результата рекомендуется повторно, через 2-4 недели, проанализировать вновь взятый образец сыворотки (плазмы) крови человека. Если оптическая плотность второго анализа снова будет в интервале от $0{,}85\times ОП_{д}$ до $ОП_{д}$ – результат следует считать отрицательным.

9.6. Титр анализируемого образца сыворотки (плазмы) крови – наибольшее разведение анализируемого образца, при котором его оптическая плотность больше либо равна величине диагностического значения оптической плотности ($ОП_{обр} \geq ОП_{д}$).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности.

В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– положительный и отрицательный контрольные образцы, конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для предварительного разведения сывороток и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– рабочий буферный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10.5. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.6. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор для предварительного разведения сывороток), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора Кандида-IgG-ИФА-БЕСТ, следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru