«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«28» 06 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к антигенам описторхисов в сыворотке (плазме) крови
(Описторх-IgM-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Описторх-IgM-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М (IgM) к антигенам описторхисов в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Выявление иммуноглобулинов класса М к антигенам описторхисов может быть использовано при диагностике острого описторхоза в комплексе с другими методами, при изучении патогенеза, иммуногенеза и эпидемиологии заболеваний описторхозом в клинических и научно-исследовательских лабораториях.

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 М к антигенам описторхисов представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сывороток (плазмы) крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами описторхисов происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-антитело» на поверхности лунок. После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки (плазмы) и добавления в лунки планшета конъюгата пероксидазы хрена с иммуноглобулинами против IgM человека происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс.

Комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интен-

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

сивность окрашивания пропорциональна концентрации IgM к антигенам описторхисов в анализируемом образце сыворотки (плазмы) крови.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

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

– положительный контрольный образец ($К^+$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgM к антигенам описторхисов, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);

– отрицательный контрольный образец ($К^-$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgM к антигенам описторхисов, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);

– конъюгат – моноклональные антитела к IgM человека, конъюгированные 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 для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12 мл);

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

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

Набор дополнительно комплектуется:

– пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;

– ванночками для реагентов – 2 шт.;

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

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

– планшет для предварительного разведения исследуемых образцов.

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфическая активность:

Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса М к антигенам описторхисов – соответствие результатов определения набором IgM к антигенам описторхисов требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-343), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с положительными сыворотками №1-№8 больше либо равны величине диагностического значения оптической плотности ($ОП_{№1-№8} \geq ОП_{Д}$).

Специфичность выявления иммуноглобулинов класса М к антигенам описторхисов – соответствие результатов определения набором IgM к антигенам описторхисов требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-284), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с отрицательными сыворотками №1-№16 меньше величины диагностического значения оптической плотности ($ОП_{№1-№16} < ОП_{Д}$).

3.2. Титр положительного стандартного образца предприятия $СОП^{+}$ (рег. № 05-2-23), аттестованного ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», должен быть не менее 1:400.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (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 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 февраля 1991 г.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других 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 помещениях, предназначенных для работы с наборами.

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

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.

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

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-655 нм;

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

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл (погрешность не более 5%);

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 300 мкл (погрешность не более 5%);

– промывочное устройство для планшетов;

– перчатки резиновые хирургические;

– флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 суток при условии отсутствия 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

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

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 при температуре от 18 до 25 °С в течение времени не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного 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 количества используемых стрипов.

Приготовленный рабочий промывочный 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.

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

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

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

7.6. Приготовление конъюгата.

Раствор конъюгата готов к использованию.

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

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента не более, чем за 5-10 мин до окончания первой инкубации и поместить в защищенное от света место.

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

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

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный 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
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

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента не более, чем за 5-10 мин до окончания второй инкубации и поместить в защищенное от света место.

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

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

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

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,

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

С-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца ($К^-$).

В остальные лунки внести в дублях по 90 мкл раствора для разведения сывороток (РРС) и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови (см п. 7.5), перемешать пипетированием. Раствор для разведения сывороток перед употреблением встряхнуть!

7.10. Определение титра исследуемых образцов.

Внесение исследуемых сывороток для определения титра произвести в семи последовательных двукратных разведениях в интервале от 1:100 до 1:12800. В лунки горизонтального ряда А внести по 180 мкл РРС и по 20 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови (см п. 7.5). В лунки рядов В-Н внести по 100 мкл РРС. Каждый образец титровать, перенося по 100 мкл раствора из лунок предыдущего ряда в лунки последующего от А до Н, тщательно перемешивая пипетированием. После растительровки из каждой лунки последнего ряда Н удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором по 100 мкл раствора, оставляя в лунках по 100 мкл.

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

7.12. По окончании инкубации снять липкую 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 промывочного раствора (см п. 7.3), с последующим отсасыванием через 30 с. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Процесс промывки повторить еще 4 раза. Общее количество отмывок равно 5.

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.14. Планшет заклеить пленкой и выдержать 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 выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

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

7.17. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и

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

раствор тетраметилбензидина, 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 ($ОП_{ср}К^-$); для каждой пары лунок, содержащих образцы исследуемых сывороток (плазмы) и последовательные разведения исследуемых сывороток (плазмы) крови.

9.2. Оценка результатов:

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,50 ед. опт. плотн.

– среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,20 ед. опт. плотн.

9.3. Только при соблюдении положений п. 9.2. можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

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

$$ОП_Д = ОП_{ср}К^- + 0{,}23,$$

где: $ОП_{ср}К^-$ – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

Результат анализа считать положительным, если $ОП_{обр} \geq ОП_Д$.

Результат анализа считать отрицательным, если $ОП_{обр} < ОП_Д$,

где: $ОП_{обр.}$ – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом сыворотки (плазмы) крови.

9.5. 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 ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

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

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. Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. 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;

– 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 набора;

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, 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;

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

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

10.5. 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 **«Описторх-IgM-ИФА-БЕСТ»**, 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