«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«28» сентября 2022 г.
м.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для иммуноферментного
количественного определения аутоантител класса G
к тканевой трансглутаминазе в сыворотке *(плазме)* крови
(IgG-Трансглутаминаза – ИФА – БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов **«IgG-Трансглутаминаза – ИФА – БЕСТ»** предназначен для определения концентрации аутоантител класса G (IgG) к тканевой трансглутаминазе (tTG) в сыворотке *(плазме)* крови человека методом иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 48 образцов, включая калибровочные *(6 образцов)* и контрольный *(1 образец)*. Возможны до 6 независимых постановок ИФА по 8 образцов в каждой *(включая калибровочные и контрольный образцы)*.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Метод определения основан на твёрдофазном иммуноферментном анализе. Анализ проводят в две стадии. На первой стадии калибровочные образцы с известными концентрациями иммуноглобулинов класса G к тканевой трансглутаминазе и исследуемые образцы инкубируют в лунках с иммобилизованной на внутренней поверхности лунок тканевой трансглутаминазой. Затем планшет отмывают. На второй стадии связавшиеся в лунках IgG к tTG обрабатывают конъюгатом антител против IgG человека с пероксидазой хрена. После отмывания избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «tTG – IgG к tTG – конъюгат» выявляют ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена *(тетраметилбензидина)*. После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом измеряют **оптическую плотность (ОП)** растворов в лунках на основной длине волны 450 нм при референсной длине волны 620–655 нм.

Степень окраски пропорциональна концентрации IgG к tTG в анализируемых образцах. После измерения величины ОП раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация IgG к tTG в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора.

<u>В состав набора входят</u>:

- планшет разборный с иммобилизованной тканевой трансглутаминазой – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно набора реагентов «Anti-Tissue-Transglutaminase IgG» *(фирма «Orgentec Diagnostika GmbH», Германия)*, содержащие известные количества аутоантител класса G к тканевой трансглутаминазе: 0; 5; 10; 20; 60; 100 Ед/мл – 6 фл. по 1,5 мл;
- контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известной концентрацией IgG к тканевой трансглутаминазе – 1 фл., 1,5 мл;
- конъюгат, концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – 1 фл., 13 мл;

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

- раствор для разведения сывороток (РС) – 2 фл. по 25 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- плёнками для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 4–200 мкл – 16 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- бланком диагностики – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. *__Воспроизводимость.__ Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG к tTG в контрольном образце не превышает 8%.

3.2. *__Линейность.__ Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчётной величины концентрации IgG к tTG при разведении калибровочных образцов, содержащих 100; 60; 20 и 10 Ед/мл IgG к tTG в 2 раза. Процент «линейности» составляет 90–110%.

3.3. *__Точность.__ Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации IgG к tTG предписанной в образце, полученном путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца с концентрацией IgG к tTG 10 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.4. *__Чувствительность__ – минимально определяемая концентрация IgG к tTG, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0, плюс 2□ *(σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0)*, не превышает 2,5 Ед/мл.

**по ГОСТ Р 51352-2013.*

3.5. Клиническая проверка. Концентрация IgG к tTG, измеренная в сыворотке крови у 500 условно здоровых доноров, не превышала 10 Ед/мл;

3.6. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить пороговые значения концентрации IgG к tTG у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а *(Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).*

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- ❖ работать в резиновых перчатках;
- ❖ не пипетировать растворы ртом;
- ❖ все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113;
- ❖ 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, позволяющий проводить измерения ОП растворов в лунках планшета 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, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению

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

средней дозы и сходимости результатов пипетирования *(погрешность не более 5%);*

- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования *(погрешность не более 5%);*
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113-00.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа использовать образцы сыворотки и плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия.

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2–8) °С не более 5 суток, либо при температуре минус (20±4) °С, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать при 3000 об/мин в течение 10−15 минут.

Нельзя использовать проросшие, гемоли-зированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ВНИМАНИЕ! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18−25) °С не менее 30 минут.
- Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5 %.
- После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник при температуре (2−8) °С.
- Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.
- Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.
- При промывке лунки *(стрипа, планшета)* заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через край лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 секунд.
- При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно ёмкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.
- Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.
- При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов *(ФСБ-Т×25, стоп-реагент, СБР, концентрат ТМБ, раствор ТМБ),* которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».
- Наконечники для пипеток *(автоматических дозаторов)* следует использовать **однократно.**
- Запрещается повторное использование планшета для предварительного разведения сывороток.
- 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,

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

например, комбинированные средства на основе ЧАС *(четвертичных аммониевых соединений),* спиртов, третичных аминов *(МУ-231-113 от 29.10.98).*

- Посуду *(ванночки)*, используемую для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.
- В случае повторного использования посуду *(ванночки)* для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду *(ванночки)* для раствора ТМБ сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.
- Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.1. Приготовление реагентов.

7.1.1. Промывочный раствор.

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 *(см. таблицу)* и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до **700 мл.**

Хранение: при (2–8) ºС до 5 суток.

7.1.2. Исследуемые образцы.

Все пробы сыворотки *(плазмы)* должны быть разведены 1:100 раствором для разведе-ния сывороток. В чистые пластиковые пробирки *(по количеству обследуемых проб)* внести по **1000 мкл РС**.

Сыворотку или плазму пациента тщательно перемешать, отобрать 10 мкл, внести в подготовленную пробирку с РС и снова тщательно перемешать.

Хранение: разведённые сыворотки при (2–8) °С до 8 часов.

7.1.3. Раствор конъюгата.

Внимание! *Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать* ***одноразовые*** *наконечники для пипеток.*

Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

Перед приготовлением раствора конъюгата в рабочем разведении необходимо тщательно перемешать содержимое флакона, не допуская вспенивания. Затем в пластиковую ванночку отобрать необходимое количество *(см. таблицу)* концентрата конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием до получения равномерного окрашивания.

Хранение: раствор конъюгата в рабочем разведении можно хранить при (18–25) °С не более 3 часов.

7.1.4. Раствор ТМБ.

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество ТМБ *(см. таблицу)* и добавить к нему соответствующее количество СБР, тщательно перемешать.

Хранение: раствор стабилен в защищённом от света месте при (18–25) °С до 3 часов.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Приготовление промывочного раствора												
ФСБ-Т×25, мл	-	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, мл	-	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении из концентрата												
Конъюгат, концентрат, мл	-	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2

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

РК, мл	-	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Приготовление раствора ТМБ в рабочем разведении												
ТМБ (концентрат), мкл	-	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
СБР, мл	-	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

7.2. Проведение иммуноферментного анализа.

7.2.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застёжкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при (2–8) °С до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор *(п. 7.1.1)*, разведённые образцы сывороток (*п. 7.1.2).*

7.2.2. Внести в соответствующие лунки в дублях по **100 мкл каждого калибровочного образца** и по **100 мкл контрольного образца**. В остальные лунки внести в дублях по **100 мкл анализируемых образцов**, разведённых в 100 раз.

7.2.3. Стрипы заклеить плёнкой и инкубировать при температуре (18–25) °С в течение **30 минут.**

За 5 минут до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении *(п. 7.1.3).*

7.2.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки 5 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

Внимание! *Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью* ***(400 мкл рабочего промывочного раствора)****. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 секунд.*

7.2.5. Внести во все лунки по **100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении** *(п. 7.1.3).*

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

Стрипы заклеить плёнкой и инкубировать при температуре (18–25) °С в течение **30 минут.**

7.2.6. По окончании второй инкубации содержимое лунок удалить и промыть лунки, как указано в п. 7.2.4.

7.2.7. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении *(п. 7.1.4).* Внести во все лунки по **100 мкл раствора ТМБ.**

Для внесения раствора ТМБ использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

Стрипы поместить в защищённое от света место при температуре (18–25) °С на **25 минут**.

7.2.8. Остановить реакцию добавлением во все лунки по **100 мкл стоп-реагента** и через 2–3 минуты измерить ОП.

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя ОП в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень *(«бланк»)* осуществлять по воздуху.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. По результатам измерения вычислить средние арифметические значения ОП для каждой пары лунок, содержащих калибровочные образцы. Построить в линейных координатах калибровоч-

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

ный график зависимости среднего арифметического значения ОП *(ед. опт. плотн.)* от заданной концентрации IgG к tTG в калибровочных образцах *(Ед/мл)*. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждой независимой постановки ИФА.

9.2. По построенному калибровочному графику определить содержание IgG к tTG в контрольном образце в Ед/мл. Полученное значение должно находиться в диапазоне значений, указанном в паспорте и на этикетке контрольного образца. Только в этом случае можно определять концентрацию IgG к tTG в исследуемых образцах. По калибровочному графику определить содержание IgG к tTG в исследуемых образцах по среднему арифметическому значению оптической плотности для каждой пары лунок.

9.3. Если концентрация IgG к tTG в анализируемом образце превышает 100 Ед/мл, образец следует исследовать дополнительно, предварительно разведя его РС ещё в 5 раз *(конечное разведение образца – 1:500)*; полученный результат в таком случае следует умножить на 5.

9.4. В сыворотке *(плазме)* крови здоровых людей IgG к tTG обычно определяются в концентрации от 0 до 10 Ед/мл. Повышенный уровень IgG к tTG *(≥10 Ед/мл)* наблюдается при глютеновой энтеропатии *(целиакии)* и герпетиформном дерматите *(болезни Дюринга)*.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности *(12 месяцев)*. Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 10 суток.

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 (2–8) °С в течение всего срока годности;
- калибровочные и контрольные образцы после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности;
- концентрат ТМБ после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности;
- ФСБ-Т×25, РПР, РС, РК, СБР и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности;
- при комплектовании набора концентратом конъюгата после вскрытия флаконов его можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности набора;
- раствор конъюгата в рабочем разведении можно хранить при температуре (18–25) °С не более 3 часов;
- раствор ТМБ в рабочем разведении можно хранить в защищённом от света месте при температуре (18–25) °С не более 3 часов;
- промывочный раствор можно хранить при температуре (2–8) °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, СБР, концентрат ТМБ, раствор ТМБ)*, которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших

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

вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики *(потребительские свойства)* которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

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

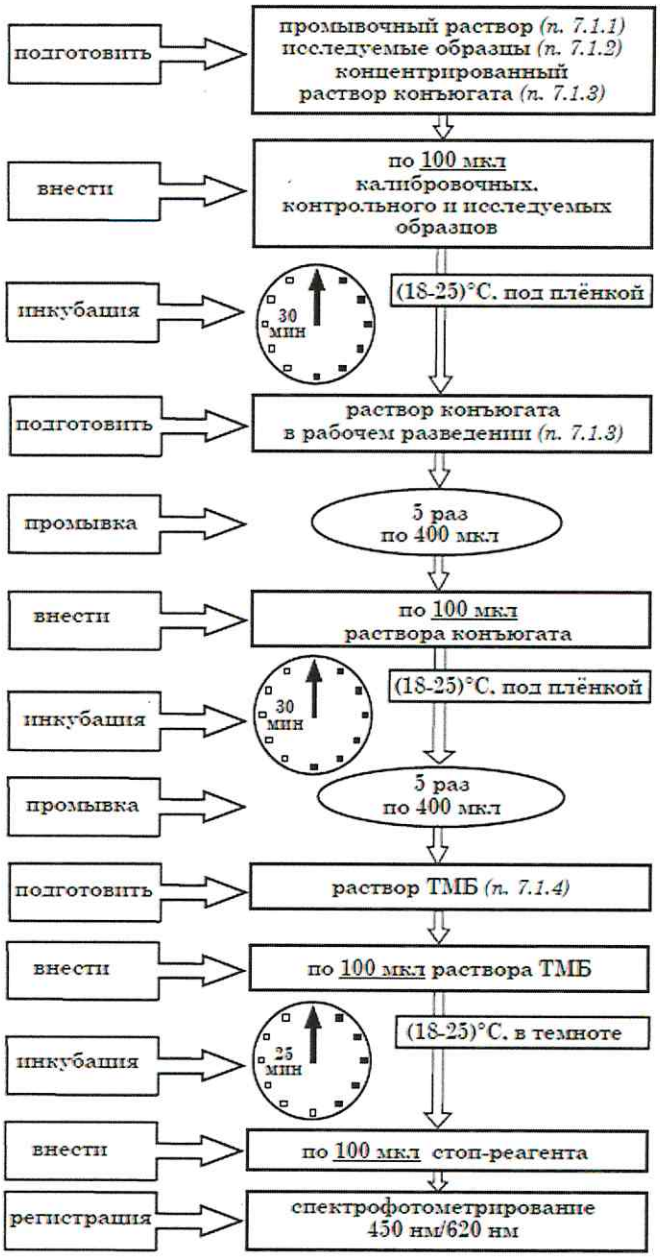
630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,
тел.: (383) 332-92-49, 227-60-30;
тел./факс: (383) 332-94-47, 332-94-44;
E-mail: plkobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ:

- Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом;
- При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются *(утилизируются)* в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов следует проводить по МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»;
- Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007;
- Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности;
- Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

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

Схема анализа D-3760



ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ n	Содержимого достаточно для проведения n количества тестов	NON STERILE	Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: *(383) 332-81-44.*

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