«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«___» _____ 2022 г.
М.П.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам *Aspergillus fumigatus*
в сыворотке крови
(Аспергилл-IgG – ИФА – БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам *Aspergillus fumigatus* в сыворотке крови «Аспергилл-IgG – ИФА – БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G (IgG) к антигенам *Aspergillus fumigatus* в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные образцы. Возможно дробное использование набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения IgG к антигенам *Aspergillus fumigatus* основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Специфическими компонентами набора реагентов являются антигены *Aspergillus fumigatus*, иммобилизованные в лунках планшетов, конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, положительный и отрицательный контрольные образцы. На первой стадии анализа при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами *Aspergillus fumigatus* происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-антитело» на поверхности лунок. После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и добавления в лунки планшета конъюгата моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс. После второй отмывки количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием раствора тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к антигенам *Aspergillus fumigatus* в анализируемом образце сыворотки. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты ИФА регистрируются измерением оптической плотности (ОП) в лунках планшета.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) *Описание*	**Кол-во**
Планшет разборный с иммобилизованными антигенами *Aspergillus fumigatus*	1 шт.
Положительный контрольный образец ($К^+$) *Содержит IgG к антигенам Aspergillus fumigatus.* *Содержит натрия азид (0,1%).*	1 фл., 1,5 мл

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

Отрицательный контрольный образец ($К^{-}$) *Не содержит IgG к антигенам Aspergillus fumigatus.* *Содержит ProClin 300 (0,05%).*	1 фл., 2,5 мл
Конъюгат *Конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена.* *Содержит ProClin 150 (0,044%); фенол (0,08%).*	1 фл., 13,0 мл
Раствор для разведения сывороток (РРС) *Содержит натрия азид (0,098%); ProClin 300 (0,02%).*	1 фл., 12,0 мл
Раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) *Содержит ProClin 300 (0,02%).*	1 фл., 10,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) *Содержит ProClin 300 (0,25 %).*	1 фл., 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) *Содержит 3,3',5,5' – тетраметилбензидин (0,025%).*	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент *Содержит кислоту серную (4,9%).*	1 фл., 12,0 мл
Планшет разборный для предварительного разведения исследуемых образцов	1 шт.
Пленки для заклеивания планшета	2 шт.
Наконечники для дозаторов на 2–200 мкл	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.

3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая чувствительность: клинические исследования, проведенные на 53 положительных клинических образцах, показали 100% чувствительность (интервал 95%–100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.2. Диагностическая специфичность: клинические исследования, проведенные на 40 отрицательных клинических образцах, показали 100% специфичность (интервал 93%–100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Стоп-реагент и раствор ТМБ обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора ТМБ на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды. Некоторые компоненты содержат ProClin 300, ProClin 150, фенол, кислоту серную, натрия азид, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2. «Состав набора».

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми и контрольными 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.

4.5. 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».

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

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует проводить по 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 оптической плотности растворов в лунках планшета при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру (37±1)°С;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- дозаторы одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 10–5000 мкл;
- дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 10–300 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

6.2. Для анализа использовать образцы сыворотки крови человека.

6.3. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре (2–8)°С не более 5 суток, или при температуре минус 18°С и ниже, если требуется более длительное хранение. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сыворотки крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. ***Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.***

– Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18–26)°С не менее 30 мин.

– При дробном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре (2–8)°С, использовать в течение всего срока годности набора. Допускается хранение ФСБ-Т×25
и стоп-реагента при температуре (2–30)°С.

– Необходимо избегать воздействие прямого солнечного света на раствор ТМБ при подготовке и проведении ИФА.

– При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, раствор ТМБ, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

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

– Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

– Для приготовления растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

– При использовании автоматического устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.

– Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих 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 (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

– В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду (ванночки) дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

– Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

– Запрещается повторное использование планшета разборного для предварительного разведения исследуемых образцов.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Перемешать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его перед разведением при температуре (30–40)°С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре (2–8) °С не более 1 месяца или при (18–26) °С не более 7 суток.

7.4. Конъюгат

Конъюгат готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество конъюгата в ванночку для реагента.

7.5. Раствор ТМБ

Раствор ТМБ готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ в ванночку для реагента.

7.6. Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РПРС). Для этого внести в лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки крови, тщательно перемешать.

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

Хранение: 10-кратно разведенные исследуемые образцы хранить не более 3 ч при температуре (18–26)°С.

7.7. Контрольные образцы ($К^+$ и $К^-$), стоп-реагент готовы к использованию.

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

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Внимание! Раствор для разведения сывороток перед использованием встряхнуть!

8.1. В одну лунку планшета, например, А-1, внести 100 мкл положительного контрольного образца ($К^+$), в две другие лунки, например, В-1 и С-1, – по 100 мкл отрицательного контрольного образца ($К^-$).

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 7.6.), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемый образец разбавляется в 100 раз.

Время внесения образцов не должно превышать 10 минут.

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

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. Внести во все лунки по 100 мкл конъю-гата (см п. 7.4.), заклеить стрипы пленкой и инкубировать 30 мин в термостате при температуре (37 ± 1)°С.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным конъюгатом)***.

8.4. По окончании второй инкубации промыть планшет как описано в п. 8.2.

8.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора ТМБ (см п. 7.5.) и инкубировать в защищенном от прямого солнечного света месте 25 мин при температуре (18–26)°С.

Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ)***.

8.6. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

8.7. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофото-метре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение при одной длине волны – 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– значение ОП в лунке с $К^+$ не менее 0,80;

– значения ОП в лунках с $К^-$ не более 0,30.

9.2. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср.}К^-$).

Вычислить диагностическое значение оптической плотности ($ОП_{Д.}$) по формуле:

$$\mathbf{ОП_{Д.} = ОП_{ср.}К^- + 0{,}30.}$$

9.3. Результат анализа считается **положительным**, если $ОП_{обр.} \geq ОП_{Д.}$.

Результат анализа считается **отрицательным**, если $ОП_{обр.} < ОП_{Д.}$,

где: $ОП_{обр.}$ – значение оптической плотности в лунке с исследуемым образцом.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8)°С. Допускается транспортирование при температуре до 26°С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2–8)°С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

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

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

10.5. Набор предназначен для однократного применения.

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

11.3. Производитель обязуется за свой счет 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
«Аспергилл-IgG - ИФА - БЕСТ»,
следует обращаться в АО «Вектор-Бест»
по адресу:

630559, Новосибирская область,
р.п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 363-35-56, 227-67-64.
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

1. Оценка анализа по коэффициенту позитивности

Результаты анализа можно оценить по коэффициенту позитивности (**КП**), рассчитывая отношение ОП в лунке с образцом пациента относительно $ОП_Д$ (п. 9.2.).

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих $\mathbf{ОП_{450} \leq 3{,}5}$ **о.е.**, использовать формулу:

$$КП_{обр.} = \frac{ОП_{450\ обр.}}{ОП_Д},$$

где $ОП_{450\ обр.}$ – ОП образца, полученная в двухволновом режиме **450 / 620–655 нм** (или только с фильтром **450 нм**).

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих $\mathbf{ОП_{450} > 3{,}5}$ **о.е.**, использовать формулу:

$$КП_{обр.} = 3{,}2 \times \frac{ОП_{405\ обр.}}{ОП_Д},$$

где $ОП_{405\ обр.}$ – ОП образца, полученная в двухволновом режиме **405 / 620–655 нм** (или только с фильтром **405 нм**).

Результат анализа **положительный**, если $КП_{обр.} \geq 1$, где $КП_{обр.}$ – коэффициент позитивности исследуемого образца.

Результат анализа **отрицательный**, если $КП_{обр.} < 1$.

Расчет КП целесообразно проводить для оценки концентрации специфических антител класса G в исследуемых образцах и при наблюдении за изменением концентрации IgG к *A. fumigatus* в динамике в парных образцах сывороток.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации IgG к антигенам *A. fumigatus* в крови, необходимо использовать наборы ре-

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

агентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

2. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «Аспергилл-IgG – ИФА – БЕСТ»

Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!

Внести: по 100 мкл $К^+$ и $К^-$;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов.

Инкубировать: 30 мин, 37°С.

Промыть: промывочным раствором,
400 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл конъюгата.

Инкубировать: 30 мин, 37°С.

Промыть: промывочным раствором,
400 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

Инкубировать: 25 мин, 18–26°С, в темноте.

Внести: по 100 мкл стоп-реагента.

Измерить: ОП при 450 нм / референсная длина волны – 620–655 нм.

3. 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
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до …		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

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

Таблица расхода компонентов

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистил.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

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