

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов

«ИФА-Краснуха-IgM»

**Тест-система иммуноферментная для выявления антител
класса М к вирусу краснухи**

НАЗНАЧЕНИЕ¹

Выявление и определение титра видоспецифических антител класса М к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе в варианте "capture" при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

СОСТАВ И БАЗОВАЯ КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	очищенные антитела к IgM человека, сорбированные на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном (используются "ломающиеся" стрипы)	1 планшет
	<i>допускается отдельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)</i>	
Контрольный положительный образец (К ⁺)	инактивированный, содержит антитела класса М к вирусу краснухи в титре 1:800; прозрачная жидкость красного цвета.	1 фл. (1,5 мл)
Контрольный образец уровня среза (К ⁺ _{пор})	инактивированный; содержит антитела класса М к вирусу краснухи в "пороговом" титре (1:100); прозрачная жидкость желтого цвета.	1 фл. (1,5 мл)
Контрольный отрицательный образец (К ⁻)	инактивированный; прозрачная, зеленого цвета, жидкость	1 фл. (1,5 мл)
Конъюгат	нативный очищенный инактивированный антиген вируса краснухи, меченный пероксидазой, прозрачная жидкость желтого цвета	1 фл. (13 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	прозрачная жидкость зеленого цвета	1 фл. (100 мл) или 2 фл. (по 50 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	1 фл. (80 мл) или 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.

¹ Взамен инструкции, утвержденной 22.12.2006 г.

2. ФСБ-Т(х25), РИ, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты.

Дополнительно набор может быть укомплектован:

вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),

стрипированным планшетом для предварительного разведения образцов (1 шт.),

одноразовыми наконечниками для автоматических пипеток (16 шт.),

клеящей пленкой для планшетов (4 шт.).

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

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации набора позволяет одномоментное исследование 96 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 6 лунок и 1 лунка – для определения уровня "бланк"). Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Число испл. обр.	1	2-9	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 антител класса М к вирусу краснухи антитела, сорбированные на поверхности лунок полистиролового планшета, связываются с IgM антителами сыворотки крови. Конъюгат – антиген вируса краснухи, меченный пероксидазой хрена, связывается с IgM-антителами, специфическими к вирусу краснухи. Присутствие в сыворотке специфических IgG-антител, ревматоидного фактора и антинуклеарных антител потенциально не оказывает влияния на результаты реакции. Образовавшийся комплекс "антитело-антитело-конъюгат" выявляется по реакции с субстратом пероксидазы – тетраметилбензидином, в результате которой меняется цвет (оптическая плотность) реакционной смеси в лунке планшета; изменение регистрируется с помощью спектрофотометра.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность (минимальный титр IgM-антител к вирусу краснухи, выявляемый набором) – 1:100.

Набор рассчитан на определение титра антител класса М к вирусу краснухи в диапазоне от 1:100 до 1:800.

Коэффициент вариации ОП контрольных сывороток (K⁺ и K⁺_{пор}) – не более 10 %.

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.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

Класс потенциального риска применения в медицинских целях по ГОСТ Р 51609-2000 – 2б.

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 рабочих разведений исследуемых образцов

По 10 мкл каждого образца смешайте с 1 мл РРО (разведение 1:100), тщательно перемешайте пипетированием.

Для предварительного разведения образцов можно использовать вспомогательный планшет; для этого внести в необходимое число его лунок по 90 мкл РРО, затем внести в них по 10 мкл исследуемых образцов, тщательно перемешать пипетированием (разведение 1:10). Рабочее разведение (1:100) будет получено непосредственно в лунках иммуносорбента.

Рабочие разведения образцов хранить не более 3 ч при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

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

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

При дробной "ручной" постановке использовать соотношения объемов ФСБ-Т(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
ФСБ-Т(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.

Приготовление остальных реагентов

Имуносорбент, К⁺, К⁻, К⁺_{пор}, РРО, конъюгат, РИ, стоп-реагент – готовы к применению.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты (кроме иммуносорбента) хранить в плотно закрытой упаковке при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

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 рамку планшета с необходимым числом стрипов. Неиспользованные стрипы из вскрытого пакета хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

2. Одну лунку (напр., А1) оставить незаполненной.

Внести (соблюдая указанную последовательность):

в две лунки (напр., В1, С1) – по 100 мкл К⁺,

в две лунки (напр., D1, E1) – по 100 мкл К⁺_{пор},

в две лунки (напр., F1, G1) – по 100 мкл К⁻,

в следующие лунки - по 100 мкл подготовленных исследуемых образцов (по 1 лунке на образец). При использовании вспомогательного планшета для разведения

образцов в соответствующие лунки иммуносорбента внести по 90 мкл РРО, а затем – по 10 мкл образцов, разведенных 1:10 в лунках вспомогательного планшета, тщательно перемешать пипетированием.

Накрыть планшет липкой пленкой .

3. Инкубировать 60 мин при температуре 37°C в защищенном от света месте.

4. С помощью промывателя удалить образцы из 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 удалить остатки влаги из лунок, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

При ручной отмывке заполненные ФСБ-Т лунки выдерживать не менее 1 мин.

5. Во все лунки (кроме лунки А1) внести по 100 мкл конъюгата.

6. Планшет закрыть клейкой пленкой. Инкубировать 30 мин при температуре 37 °С в защищенном от света месте.

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

При ручной промывке промыть планшет 5 раз. Заполненные ФСБ-Т лунки выдерживать не менее 1 мин.

8. Во все лунки внести по 100 мкл раствора индикаторного, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и выдержать 30 мин при температуре от 21 до 25 °С.

9. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился индикаторный раствор внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и не более чем через 10-15 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. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм. Оптический нуль фотометра ("бланк") устанавливается против воздуха.

Результаты ИФА учитываются при следующих условиях:

среднее значение $ОП(K^+) \geq 0,50$;

среднее значение $ОП(K^+_{пор}) \geq 0,20$;

отношение $ОП(K^-) / ОП(K^+_{пор}) \leq 0,50$;

значение ОП "бланк" $\leq 0,15$;

среднее значение $ОП(K^-) \leq 0,15$.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Качественный учет результатов

Исследуемые образцы учитываются:

как положительные при $ОП > 1,1 \times ОП(K^+_{пор})$,

как отрицательные при $ОП < 0,9 \times ОП(K^+_{пор})$.

Образцы с ОП в пределах от $0,9 \times \text{ОП}(K^+_{\text{пор}})$ до $1,1 \times \text{ОП}(K^+_{\text{пор}})$, т.е. в так называемой "серой" зоне, рекомендуется исследовать повторно, поскольку результаты, полученные в ней, не могут быть однозначно интерпретированы.

При повторном получении указанного результата, рекомендуется мониторинг наличия антител у пациента для исключения неспецифических реакций, которые также могут давать сомнительные результаты.

Полуколичественный учет результатов

В образцах, оцененных как положительные, может быть определен титр IgM-антител к вирусу краснухи, для чего на бланке калибровочного графика по точкам, ординатами которых (пропорциональная шкала) служат полученные значения ОП(K^+) и ОП($K^+_{\text{пор}}$), а абсциссами (логарифмическая шкала) - значения титров IgM-антител в K^+ и $K^+_{\text{пор}}$ (1:800 и 1:100), следует провести прямую линию и найти на ней точку, ординатой которой является полученное значение ОП исследуемого образца; абсцисса указанной точки будет соответствовать искомому значению титра IgM-антител.

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

В упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Транспортирование

При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества набора «ИФА-Краснуха-IgM», 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 и в учреждение, уполномоченное Росздравнадзором на проведение государственного контроля качества указанной продукции.

**КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА
(ИФА-Краснуха-IgM)**

<u>Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!</u>	
Внести	лунку А1 оставить незаполненной; в лунки В1, С1 – по 100 мкл К ⁺ , в лунки D1, E1 – по 100 мкл К ⁺ _{пор} , в лунки F1, G1 – по 100 мкл К ⁻ , в следующие лунки - по 100 мкл подготовленных исследуемых образцов (по 1 лунке на образец)
Инкубация	60 мин, 37 °С
Промыть	4 раза ФСБ-Т
Внести	по 100 мкл конъюгата в каждую лунку (кроме А1)
Инкубация	30 мин, 37 °С
Промыть	4 раза ФСБ-Т (при использовании вошера) или 5 раз при ручной промывке
Внести	по 100 мкл индикаторного раствора в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 21-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по воздуху

Май 2014 г.