ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов

"ИФА-антиТОРЧ-IgG-авидность"
ТЕСТ-СИСТЕМА ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНДЕКСА АВИДНОСТИ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G
К ВОЗБУДИТЕЛЯМ ИНФЕКЦИЙ ГРУППЫ TORCH

Комплект № 2
"ИФА-антиКраснуха-IgG-авидность"
Тест-система иммуноферментная для определения индекса авидности видоспецифических иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи

РУ № ФСР 2011/12217 от 03.11.2011 г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Определение индекса авидности иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови человека методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	лизатный очищенный инактивированный антиген вируса краснухи, сорбированный на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном (используются "ломающиеся" стрипы)	1 планшет
	допускается раздельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)	
Контрольный положительный образец (К+)	инактивированный; содержит высокоавидные видоспецифические иммуноглобулины класса G; прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный положительный низкоавидный образец (К+$_{НА}$)	инактивированный; содержит низкоавидные видоспецифические иммуноглобулины класса G; прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный положительный образец уровня среза (К+$_{пор}$)	инактивированный; содержит высокоавидные видоспецифические иммуноглобулины класса G в "пороговом" титре (1:100); прозрачная жидкость желтого цвета	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный отрицательный образец (К-)	инактивированный; прозрачная жидкость зеленого цвета	1 фл. (1,2 мл)
Диссоциирующий раствор (ДР)	прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (6,0 мл)
Конъюгат	антитела мышиные моноклональные против иммуноглобулинов человека класса G, меченые пероксидазой хрена; прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (13 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	прозрачная жидкость синего цвета	1 фл. (15 мл)
Раствор для предварительного разведения образцов (РПРО)	прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (15 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(х25)]	прозрачная или 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.

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

Набор может быть дополнительно укомплектован:

вспомогательным планшетом (1 шт.),

вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),

одноразовыми наконечниками для автоматических пипеток (16 шт.),

клейкой пленкой для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

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

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовые варианты всех комплектов набора позволяют исследование 48 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 8 лунок, 2 лунки – для выведения уровня "бланк" спектрофотометра). Предусмотрена возможность проведения раздельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	2	4	6	8	10	12
Число иссл. обр.	1-3	4-11	12-19	20-27	28-35	36-43

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Видоспецифические иммуноглобулины класса G связываются с антигеном соответствующего возбудителя, сорбированным на поверхности лунок полистиролового планшета. Под действием диссоциирующего раствора комплексы /антиген возбудителя-низкоавидные видоспецифические IgG / диссоциируют; степень диссоциации зависит от авидности IgG к антигену возбудителя.

Недиссоциированные комплексы связываются с конъюгатом – антителами против IgG человека, меченными пероксидазой хрена. Далее, после добавления индикаторного раствора (хромоген - тетраметилбензидин) в результате ферментативной реакции реакционная смесь в лунках планшета окрашивается пропорционально концентрации видоспецифических антител класса G, связанных с конъюгатом. Реакция останавливается добавлением стоп-реагента. Интенсивность окрашивания (оптическая плотность) регистрируется с помощью спектрофотометра.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность и специфичность набора при проверке на сыворотках стандартизованной панели предприятия или аналогичных коммерческих панелей, разрешенных к использованию в РФ -100 %.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Нативная сыворотка (плазма) крови человека объемом не менее 10 мкл, в которой предварительно установлено наличие и определено содержание в МЕ/мл (или титр) видоспецифических иммуноглобулинов класса G.

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.

Использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным ростом может привести к ошибочным результатам.

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.

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 21 до 25 °С.

Предварительное разведение исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести 1:10 во вспомогательном планшете, для чего внести в его лунки по 90 мкл РПРО, затем внести в них по 10 мкл сыворотки, тщательно перемешать пипетированием. При этом розовый цвет должен измениться на желтый. Если изменение цвета не произошло, данный образец необходимо исследовать повторно с целью исключения неправильных результатов. Рабочее разведение (1:100) готовить непосредственно в лунках иммуносорбента (см. раздел **Проведение ИФА ("ручная" постановка)**, п. 2).

Предварительные разведения образцов хранить не более 6 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

Реагент	Объем реагента, мл, на .....стрипов					
	2	4	6	8	10	12
ФСБ-Т(х25)	7	13	20	27	33	40
Вода очищенная	до 175	до 325	до 500	до 675	до 825	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, $К^+$, $К^+_{НА}$, $К^+_{пор.}$ $К^-$, РРО, РПРО, конъюгат, ДР, РИ, стоп-реагент – готовы к применению.

Неиспользованные реагенты хранить в плотно закрытых флаконах 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 хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

2.Внести

в две лунки А1, А2 – по 100 мкл РРО,

в две лунки В1, В2 – по 100 мкл $К^+$,

в две лунки С1, С2 – по 100 мкл $К^+_{НА}$,

в две лунки D1, D2 – по 100 мкл $К^+_{пор}$,

в две лунки Е1, Е2 – по 100 мкл $К^-$,

В оставшиеся лунки нечетного и четного рядов иммуносорбента (напр., F1 и F2; G1 и G2; A3 и A4, B3 и B4 и т.д.) внести по 90 мкл РРО, а затем – по 10 мкл образцов, разведенных 1:10 в лунках вспомогательного планшета (см. раздел «Предварительное разведение исследуемых образцов»), тщательно перемешать пипетированием.

3. Инкубировать 30 мин при температуре от 21 до 25 °С в защищенном от света месте.

4. С помощью промывателя удалить образцы из лунок, 4 раза промыть планшет ФСБ-Т, внося в лунки 350-370 мкл раствора. При наличии промывателя, позволяющего производить промывку в режиме "Overflow", использовать именно этот режим.

5. Внести в лунки нечетных рядов по 100 мкл ФСБ-Т, а в лунки четных рядов – по 100 мкл ДР.

6. Инкубировать 5 мин при температуре от 21 до 25 °С.

7. С помощью промывателя удалить жидкость из лунок, 4 раза промыть стрипы ФСБ-Т, как указано в п. 4.

8. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата, выдержать 30 мин при температуре от 21 до 25 °С.

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

10. Во все лунки внести по 100 мкл раствора индикаторного, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и выдержать 10-15 мин при температуре от 21 до 25 °С.

11. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился раствор индикаторный) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и не более чем через 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, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по лунке А1.

Рассчитать индексы авидности (ИА) по формуле

$ИА = (ОП_{обр+ДР}/ОП_{обр+ФСБ-Т})\times 100\ \%$,

где $ОП_{обр+ДР}$ – ОП в лунках с ДР,

$ОП_{обр+ФСБ-Т}$ – ОП в лунках с ФСБ-Т.

Результаты ИФА учитываются при следующих условиях:

среднее значение $ОП_{К+}$ – не менее 0,60;

среднее значение $ОП_{К+пор}$ – не менее 0,20;

среднее значение $ОП_{К-}$ – не более 0,10;

$ИА(К^+)$ – более 50 %.

$ИА(К^+_{НА})$ – менее 40 %.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Интерпретация результатов

Значение ИА	Интерпретация
менее 40 %	в образце низкоавидные IgG к вирусу краснухи
40-45 %	неопределенные значения
более 45 %	в образце высокоавидные IgG к вирусу краснухи

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

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества набора, 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-антиКраснуха-IgG-авидность")

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в две лунки А1, А2 – по 100 мкл РРО, в две лунки В1, В2 – по 100 мкл $К^+$, в две лунки С1, С2 – по 100 мкл $К^+_{НА}$, в две лунки D1, D2 – по 100 мкл $К^+_{пор}$, в две лунки Е1, Е2 – по 100 мкл $К^-$, В оставшиеся лунки нечетного и четного рядов иммуносорбента (напр., F1 и F2; G1 и G2; A3 и A4, B3 и B4 и т.д.) внести по 90 мкл РРО, а затем – по 10 мкл образцов, разведенных 1:10 в лунках вспомогательного планшета (см. раздел «Предварительное разведение исследуемых образцов»), тщательно перемешать пипетированием.
Инкубация	30 мин, 21-25 °С
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	в лунки нечетных рядов – по 100 мкл ФСБ-Т, а в лунки четных рядов – по 100 мкл ДР
Инкубация	5 мин, 21-25 °С
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	по 100 мкл конъюгата в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 21-25 °С
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	по 100 мкл индикаторного раствора в каждую лунку
Инкубация	10-15 мин, 21-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по лунке А1

Март 2015 г.