

Код ОКП 939817

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 200 г.
№

«УТВЕРЖАЮ»

Генеральный директор
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические
системы»

И. Е. Колосов

« 200 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-RF-M»

**Тест-система иммуноферментная для качественного и
количественного определения ревматоидного фактора класса М**

1. Назначение

1.1. Набор реагентов «ДС-ИФА-RF-M» предназначен для качественного и количественного определения ревматоидного фактора класса М в сыворотке (плазме) крови человека с целью определения иммунного статуса пациента.

1.2. Ревматоидный фактор (RF) – это иммуноглобулины человека классов М, G, А направленные против Fc-фрагмента IgG человека, который также может реагировать с IgG других млекопитающих. RF обнаруживается в сыворотке больных ревматоидным артритом (РА) в 60-90% случаев и является одним из диагностических критериев данного заболевания. В популяции здоровых людей моложе 40 лет RF обнаруживается менее чем в 5% случаев, с увеличением возраста популяции частота встречаемости RF повышается и у людей старше 75 лет достигает 40%.

Высокий уровень RF класса М у людей, не болеющих РА, ассоциируется с повышенным риском его развития. Больные РА имеющие RF-M в крови склонны к более агрессивному течению болезни и к худшему ее исходу. При этом высокий титр RF-M коррелирует с наличием суставных заболеваний и узелков, но не с системным проявлением болезни.

Обнаружение RF-M у новорожденных является дополнительным маркером внутриутробной инфекции.

Также RF-M может являться причиной ложноположительных результатов в методах непрямого иммуноферментного анализа антител класса M.

Кроме того, RF-M может обнаруживаться в сыворотке крови пациентов больных аутоиммунными и инфекционными заболеваниями (табл.1).

Таблица 1.

Частота обнаружения RF-M при различных заболеваниях и у здоровых людей.

Заболевания	Частота выявления RF-M, %
Ревматоидный артрит	60-90
Ювенильный ревматоидный артрит	<20
Первичный билиарный цирроз	45-70
Псориатическая артропатия	30-70
Лимфопролиферативные опухоли	до 50
Вирусный гепатит	20-40
Грипп	15-65
Системная красная волчанка	15-35
Системная склеродермия	20-30
Инфаркт миокарда	10-20
Полимиозит	<10
Туберкулез	<10
Здоровые люди (моложе 70 лет)	<5

Количественное определение RF-M проводится: 1) при обследовании пациентов с подозрением на ревматоидный артрит; 2) для контроля лечения ревматоидного артрита.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах в 48 пробах (40 неизвестных проб, одна проба контрольной сыворотки, шесть стандартных калибровочных проб и одна проба для определения оптической

плотности ТМБ-Субстратного раствора) при одновременном использовании всех стрипов планшета.

В случае дробного применения набора необходимо обязательное использование: при каждой постановке для качественного анализа – Калибратора 0, Калибратора 2, Калибратора 5 и контроля ТМБ-Субстратного раствора; при каждой постановке для количественного анализа - всех стандартных калибровочных проб, контрольной сыворотки и контроля ТМБ-Субстратного раствора.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия.

Метод определения основан на «сэндвич» варианте двухстадийного иммуноферментного анализа. В лунках планшета полистиролового разборного сорбированы иммуноглобулины класса G кролика. При добавлении образца сыворотки происходит связывание RF класса M (RF-M) с Fc фрагментом IgG кролика. После отмывки иммуносорбента добавляются антитела козы против антител человека класса M, конъюгированные с пероксидазой хрена. Во время инкубации эти антитела связываются с RF-M, при наличии его в образце исследуемой сыворотки.

После отмывки иммуносорбента определяется активность пероксидазы, связавшейся с антителами в лунках планшета. Количество связанного антителами конъюгата пропорционально количеству RF-M в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация RF-M в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора:

- иммуносорбент – планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок иммуноглобулинами класса G кролика, маркирован «Иммуносорбент» - 1 шт;

- конъюгат - антитела козы против иммуноглобулинов класса M человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; прозрачная или слегка опалесцирующая жёлтого цвета жидкость, допустимо образование аморфного осадка, при встряхивании распадающегося и приводящего к помутнению раствора; маркирован «Конъюгат» - 1 фл. (12,5 мл);

- стандартные калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие ревматоидный фактор класса M в концентрациях, указанных на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества; стандартная калибровочная проба №0 - прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость, стандартные калибровочные пробы №1 - №5 - прозрачные или слегка опалесцирующие малиново-красного или красно-оранжевого цвета разной интенсивности жидкости; маркированы:

«Калибратор 0» - 1 фл. (1,5 мл);

«Калибратор 1» - 1 фл. (1,5 мл);

«Калибратор 2» - 1 фл. (1,5 мл);

«Калибратор 3» - 1 фл. (1,5 мл);

«Калибратор 4» - 1 фл. (1,5 мл);

«Калибратор 5» - 1 фл. (1,5 мл).

- контрольная сыворотка с известным содержанием RF-M; прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость; значение концентрации ревматоидного фактора в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 фл. (1,5 мл);

- раствор для предварительного разведения сывороток; прозрачная жидкость сине-фиолетового цвета; маркирован «PPC» - 1 фл. (12,5 мл);

- блок-раствор; прозрачная или слегка опалесцирующая розового цвета жидкость, допустимо образование аморфного осадка, при встряхивании распадающегося и приводящего к помутнению раствора; маркирован «БР» - 1 фл. (12,5 мл);

- промывочный раствор, концентрат; прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании; маркирован «ПР (концентрат х 25)» - 1 фл. (50,0 мл);

- ТМБ-Субстратный раствор; прозрачная бесцветная жидкость; маркирован «ТМБ-Субстратный раствор» - 1 фл. (12,0 мл);

- серная кислота в концентрации 0,2 моль/л; прозрачная бесцветная жидкость; маркирована «Стоп-реагент/0,2М» - 1 фл. (15,0 мл);

- бланк для построения калибровочной кривой – 1 шт;

- планшет для предварительного разведения сывороток – 1 шт;

- инструкция по применению – 1 шт.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

-крышка к полистироловым 96-луночным планшетам;

-одноразовые наконечники;

-пластиковая ванночка для жидких реагентов;

-пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом.

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация RF-M в сыворотке крови человека составляет не более 2 МЕ/мл

3.2. Коэффициент вариации результатов определения RF-M в одном и том же образце с использованием набора не превышает 8%.

3.3. Зависимость концентрации RF-M в образцах сывороток крови имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2 - № 5. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» RF-M – соответствие измеренной концентрации RF-M предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов калибровочной пробы 10 МЕ/мл и контрольной сыворотки. Процент открытия составляет от 90 до 110%.

3.5. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора установить собственные значения нормального и патологического уровня RF.

4. Меры предосторожности

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. Стоп-реагент представляет собой 0,2 М раствор серной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. исследуемые образцы сывороток крови являются потенциально инфицированным материалом, в котором длительное время могут сохраняться возбудители ВИЧ, парентеральных вирусных гепатитов и других инфекционных заболеваний.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- устройство для промывания планшетов (вошер);
- термостат для инкубации при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$;
- дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный (200 мл, 500 мл);
- стакан стеклянный (500 мл);
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. Анализируемые образцы сывороток крови человека

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3-х суток. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000–2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

7. Подготовка реагентов для анализа

7.1. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока их годности!

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре (от 18 до 24 °С).

7.2. Иммуносорбент. **Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре (от 18 до 24 °С) в закрытом пакете не менее 30 минут!**

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку.

7.3. ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом ПР тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора отобрать в отдельную ёмкость и добавить соответствующее количество воды дистиллированной. Полученный раствор тщательно перемешать.

7.4. Конъюгат – готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать и отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

7.5. Стандартные калибровочные пробы – готовы к применению.

7.6. Контрольная сыворотка - готова к применению.

7.7. РРС (раствор для предварительного разведения сывороток) - готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать и отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

7.8. БР (блок-раствор) – готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать и отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

7.9. ТМБ-Субстратный раствор - готов к применению.

7.10. Стоп-реагент – готов к применению.

8. Проведение анализа

8.1. Перед использованием иммуносорбент промыть 2 раза рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

8.2. Исследуемые сыворотки развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РРС). Для этого внести в лунки вспомогательного планшета 90 мкл раствора, добавить 10 мкл сыворотки. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием, при этом фиолетово-синий цвет должен измениться на голубовато-зеленый.

8.3. Постановка качественного анализа.

Стандартные калибровочные пробы рекомендуется вносить по следующей схеме: в лунки иммуносорбента А1, А2 дозатором пипеточным внести по 100 мкл «Калибратора 0», в лунки В1, В2 – по 100 мкл «Калибратора 2» и в лунки С1, С2 – по 100 мкл «Калибратора 5», лунки D-1, D-2 - оставить для измерения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора.

Постановка количественного анализа.

Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку рекомендуется вносить по следующей схеме: в лунки иммуносорбента А-1, А-2 дозатором пипеточным внести по 100 мкл «Калибратора 0», в лунки В-1, В-2 - по 100 мкл «Калибратора 1», в лунки С-1, С-2 - по 100 мкл «Калибратора 2», в лунки D-1, D-2 – по 100 мкл «Калибратора 3», в лунки Е-1, Е-2 - по 100 мкл «Калибратора 4», в лунки F-1, F-2 - по 100 мкл «Калибратора 5», в лунки G1 и G2 – по 100 мкл контрольной сыворотки. Лунки H1 и H2 оставить для измерения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки в двух повторах внести по 90 мкл БР и по 10 мкл предварительно разведенных (1:10) образцов исследуемых сывороток, (конечное разведение сывороток в лунках – 1:100). Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием. Планшет закрыть крышкой и выдержать в течение 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!

8.4. Содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 4 раза рабочим ПР, как в п. 8.1.

8.5. Во все лунки планшета, кроме лунок D-1 и D-2 (или H1 и H2), внести по 100 мкл конъюгата. Планшет закрыть крышкой и выдержать в течение 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

8.6. Содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 4 раза рабочим ПР, как в п. 8.1.

8.7. ТМБ-Субстратный раствор внести по 100 мкл раствора во все лунки отмытого планшета, планшет выдержать 20 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 $^\circ\text{C}$.

8.8. Реакцию остановить добавлением во все лунки стрипов по 150 мкл стоп-реагента, и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

9. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при двух длинах волн: 450 /620-680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм.

10. Учет результатов

10.1. Учет результатов

Реакцию учитывать, если среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с Калибратором 5 - не менее 1,3, среднее значение ОП ТМБ-Субстратного раствора не должно превышать 0,1.

10.2. Интерпретация результатов.

1) При качественном анализе: положительным считать образец со значением ОП, равным или превышающим среднее значение ОП калибратора 2.

Отрицательным считать образец со значением ОП менее среднего значения ОП калибратора 2.

	Содержание RF-M в образце сыворотки (МЕ/мл)
нормальный уровень	менее 20
повышенный уровень	20 и более

Положительный результат должен быть подтвержден клиническим статусом пациента.

2) При количественном анализе - необходимо построить калибровочный график по средним величинам ОП «Калибратора 0»; «Калибратора 1»; «Калибратора 2»; «Калибратора 3»; «Калибратора 4»; «Калибратора 5». На бланке для построения калибровочной кривой по оси ординат Y откладывают средние значения ОП стандартных калибровочных проб, по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации антител, выраженной в МЕ/мл. По полученным точкам строят калибровочную кривую.

Для образцов со значением ОП, превышающим среднее значение ОП «Калибратора 2» определяют концентрацию антител RF-M по калибровочному графику.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций RF-M в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации RF-M в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

10.3. Если значение ОП сыворотки превышает среднее значение ОП Калибратора 5, для точного определения необходимо переставить данный образец повторно в большем разведении. Рекомендуемое конечное

разведение - 1:400. Для приготовления разведения 1:400 в лунку вспомогательного планшета внести 195 мкл РРС и 5 мкл исследуемого образца (разведение в лунке составит 1:40). Затем в две лунки иммуносорбента внести по 90 мкл БР и по 10 мкл сыворотки, разведённой в 40 раз (при этом конечное разведение в лунке составит 1:400). Дальнейший анализ проводить в соответствии п.п. 8.3.-8.8. При учете результатов количество антител в образце будет равно полученному в результате анализа значению концентрации антител, умноженному на 4.

11. Условия хранения и эксплуатации набора

11.1. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности. Срок годности набора – 13 месяцев.

11.2. Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток.

11.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- Иммуносорбент - пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 месяца при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

- ПР (концентрат х 25) - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат х 25) хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С;

- Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С.

- Конъюгат – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Стандартные калибровочные пробы – после вскрытия флакона оставшиеся неиспользованными калибраторы хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Контрольная сыворотка - после вскрытия флакона оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- РРС (раствор для предварительного разведения сывороток) - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным РРС хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

- БР (блок-раствор) – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным БР хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

- ТМБ-Субстратный раствор - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ-Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

- Стоп-реагент – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным Стоп-реагент хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

11.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12

Директор ООО
«Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»
по производству


Г. А. Полянская

«СОГЛАСОВАНО»
Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»


профессор Долгов В.В.
200 г.



Подпись *В.В. Долгове*
удостоверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
подпись: *Лед 25.04.08*