

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса G
к антигенам *Clonorchis sinensis*
в сыворотке (плазме) крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Клонорхис-IgG – ИФА – БЕСТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-2958

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Выявление иммуноглобулинов класса G к антигенам *Clonorchis sinensis* может быть использовано при диагностике клонорхоза в комплексе с другими методами, при изучении патогенеза, иммуногенеза и эпидемиологии заболеваний клонорхозом в клинических и научно-исследовательских лабораториях.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализов в дублях 45 неизвестных, 3 контрольных образцов, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения иммуноглобулинов класса G к антигенам клонорхисов представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сывороток (плазмы) крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами клонорхисов происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-антитело» на поверхности

лунок. После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки (плазмы) и добавления в лунки планшета конъюгата пероксидазы хрена с иммуноглобулинами против IgG человека происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс.

Комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. После добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–650 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к антигенам клонорихов в анализируемом образце сыворотки (плазмы) крови.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антигенами клонорихов, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+ ; прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец (K^- ; прозрачная жидкость желтого цвета) – 1 фл., 2,5 мл;
- конъюгат, концентрат (моноклональные антитела к IgG человека с пероксидазой хрена, прозрачная жидкость синего цвета) – 1 фл., 1,5 мл;

- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25; прозрачная бесцветная жидкость, допускается наличие небольшого осадка солей, исчезающего при нагревании) – 1 фл., 28,0 мл;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС; прозрачная жидкость малинового цвета) – 1 фл., 10,0 мл;
- раствор для разведения сывороток (РРС; прозрачная жидкость зеленого цвета) – 1 фл., 28,0 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР; прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 13,0 мл;
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 1,0 мл;
- стоп-реагент (прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 12,0 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки – 16 шт.;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В ряде случаев возможен перекрест иммунологических реакций при заболеваниях описторхозом, что может быть связано как с совместной инвазией, так и со взаимодействием антител с гетерологичным антигеном за счет наличия общих антигенных компонентов. При получении положительного результата следует подтвердить диагноз прямыми методами (дуоденальное зондирование, копроовоскопия).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными.

Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Ми-

нистерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

4.8. Точность и воспроизводимость результатов анализа зависят от строгого выполнения следующих правил:

– не используйте реагенты с истекшим сроком годности;

– при постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, РПРС, СБР, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест»;

– *запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей;*

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

– используйте стеклянную посуду, тщательно вымытую и ополоснутую дистиллированной водой, или (предпочтительно) одноразовую посуду;

– не допускайте высыхания стрипов в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов;

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором субстрата;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими при-

месями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

- необходимо следить за состоянием промывочного устройства – регулярно обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом;

- рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

- никогда не используйте одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и рабочего раствора ТМБ; обращаем Ваше особое внимание на то, что малейшее, даже не видимое глазом загрязнение пипеток раствором конъюгата может привести к контаминации всего содержимого флаконов с СБР и ТМБ, поэтому необходимо протирать рабочую поверхность стола и конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом перед внесением ТМБ в СБР;

- проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы;

- не изменяйте протокол исследования;

- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–650 нм; или при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37\pm 1)^\circ\text{C}$;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей до 300 мкл (погрешность не более 5%);
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы крови у обследуемых лиц в количестве не менее 0,5 мл отбирают из вены или из пальца натошак. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

6.4. Для отбора исследуемых образцов и компонентов набора реагентов использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%. Следует обратить внимание на точное дозирование и тщательное перемешивание сывороток с раствором, используемым для их разведения. От соблюдения этих требований зависит точность и воспроизводимость результатов анализа.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты набора, в том числе запечатанный пакет с планшетом, и образцы сывороток (плазмы) крови при температуре от 18 до 25°C не менее 60 мин.

7.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

7.2.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

7.2.2. После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть заворачивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение всего срока годности набора.

7.3. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество одновременно используемых стрипов	Рабочий раствор ФСБ-Т		Рабочий раствор коньюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина	
	ФСБ-Т, концен- трат мл	Вода дистил., мл	Коньюгат, концентрат, мл	Рабочий раствор ФСБ-Т, мл	ТМБ, концентрат, мл	СБР, мл
1	2,0	до 50	0,1	1,0	0,05	1,0
2	4,0	до 100	0,2	2,0	0,10	2,0
3	6,0	до 150	0,3	3,0	0,15	3,0
4	8,0	до 200	0,4	4,0	0,20	4,0
5	10,0	до 250	0,5	5,0	0,25	5,0
6	12,0	до 300	0,6	6,0	0,30	6,0
7	14,0	до 350	0,7	7,0	0,35	7,0
8	16,0	до 400	0,8	8,0	0,40	8,0
9	18,0	до 450	0,9	9,0	0,45	9,0
10	20,0	до 500	1,0	10,0	0,50	10,0
11	22,0	до 550	1,1	11,0	0,55	11,0
12	24,0	до 600	1,2	12,0	0,60	12,0

7.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО ФОСФАТНО-СОЛЕВОГО БУФЕРНОГО РАСТВОРА С ТВИНОМ

Рабочий фосфатно-солевой буферный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

Хранение: не более 5 суток при 2–8°C.

7.5. ПОДГОТОВКА КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

7.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЬЮГАТА

В зависимости от числа используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество рабочего раствора ФСБ-Т, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Хранение: до 3 часов при 18–25°C.

7.7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА

Внимание! Рекомендуется выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином. Посуду и наконечники для пипетки, контактирующие с раствором ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество СБР, добавить соответствующее количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

Допустимо голубое окрашивание рабочего раствора ТМБ, которое не оказывает влияния на результаты анализа.

Хранение: не более 3 часов при 18–25°C в темноте.

7.8. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ (ПЛАЗМЫ) КРОВИ

Исследуемые образцы сывороток (плазмы) крови предварительно развести в 10 раз рас-

твором для предварительного разведения сывороток, используя стрипы дополнительного планшета. Для этого внести в лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл исходной исследуемой сыворотки (плазмы), тщательно перемешать. При этом цвет раствора в лунках должен измениться с малинового на желтый. Если изменения цвета не произошло, результат анализа данной сыворотки может быть неправильным.

Хранение: не более 3 часов при 18–25°C.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

8.1. Внести контрольные образцы:

- **1 лунка** – 100 мкл K^+ ;
- **2 лунки** – по 100 мкл K^- .

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл образцов сывороток (плазмы) крови в предварительном разведении (п. 7.8.), тщательно перемешать, таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

Внесение исследуемых сывороток для определения титра произвести в семи последовательных двукратных разведениях в интервале от 1:100 до 1:12800. В лунки горизонтального ряда А внести по 200 мкл разведения 1:100 исследуемых образцов, приготовленных, как описано в п. 7.8. В лунки рядов В–Н внести по

100 мкл РРС. Каждый образец титровать, перенося по 100 мкл раствора из лунок предыдущего ряда в лунки последующего от А до Н, тщательно перемешивая пипетированием. После раститровки из каждой лунки последнего ряда Н удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором по 100 мкл раствора, оставляя в лунках по 100 мкл.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37°C.

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз рабочим раствором ФСБ-Т (п. 7.4.) с помощью промывочного устройства. При этом в каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.6.).

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37°C.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.4. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть стрипы 5 раз так, как указано в п. 8.2.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (п. 7.7.) и инкубировать в темноте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°C.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.6. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента (при этом цвет раствора в лунках меняется на желтый).

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–650 нм. Допускается измерение оптической плотности на одной длине волны – 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

- Внести:** по 100 мкл K^+ и K^- ;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл
предварительно разведенных
исследуемых сывороток.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** рабочим раствором ФСБ-Т,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора
конъюгата.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** рабочим раствором ФСБ-Т,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора
тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реактанта.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная
длина волны 620–650 нм.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

11.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом; для каждой пары лунок, содержащих образцы исследуемых сывороток (плазмы) и последовательные разведения исследуемых сывороток (плазмы) крови.

11.2. Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,8 ед. опт. плотн.

Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср. K^-}$) должно быть не более 0,25 ед. опт. плотн.

11.3. Оценку результатов проводить при условии полного выполнения положений п. 11.2.

11.4. На основании полученных данных вычислить диагностическое значение оптической плотности ($ОП_{д}$) по формуле:

$$ОП_{д} = ОП_{ср} K^- + 0,30$$

11.5. Результат анализа считают **положительным**, если $ОП_{обр} \geq ОП_{д}$.

Результат анализа считают **отрицательным**, если $ОП_{обр} \leq 0,85 \times ОП_{д}$,

где $ОП_{обр}$ – среднее значение оптической плотности анализируемого образца в лунке, ед. опт. плотн.

Если оптическая плотность исследуемой сыворотки находится в диапазоне от $0,85 \times ОП_{д}$ до $ОП_{д}$, то результат следует считать **сомни-**

тельным и через 2–4 недели необходим повторный анализ вновь взятого образца сыворотки крови данного человека.

11.6. Титр анализируемого образца сыворотки (плазмы) крови – наибольшее разведение анализируемого образца, при котором его оптическая плотность больше либо равна величине диагностического значения оптической плотности ($ОП_{обр} \geq ОП_{д}$).

11.7. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации иммуноглобулинов класса G к антигенам клонорхисов в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

12.1. Набор «Клонорхис -IgG – ИФА – БЕСТ» должен храниться и транспортироваться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности (9 мес).

Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

12.2. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности.

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

По вопросам, касающимся качества набора,
следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район,
п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46,
тел./факс (383) 332-67-49;
e-mail: vbobtk@vector-best.ru

13.12.09.

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: www.vector-best.ru