

Общество с ограниченной ответственностью
Научно-производственное объединение «Иммунотэкс»

21.20.23.110.

УТВЕРЖДАЮ
Директор
ООО НПО «Иммунотэкс»
_____ М.В. Батурин
«__» _____ 20__ г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgG-АУТОАНТИТЕЛ К ТКАНЕВЫМ АНТИГЕНАМ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИН ВИТРО
(IgG-Ауто-АТ-ИФА)**

по ТУ 21.20.23-014-73678649-2017

Содержание

1. НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.....	9
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.	11
4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.....	12
5. ПЕРЕЧЕНЬ РИСКОВ, СВЯЗАННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАБОРА, И ПУТИ ИХ СНИЖЕНИЯ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ДОСТОВЕРНОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА.....	12
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	13
7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	14
8. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.....	14
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	15
10. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА	17
11. РАСЧЕТЫ.....	17
12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.	18
13. УНИЧТОЖЕНИЕ И УТИЛИЗАЦИЯ НАБОРА.....	19
14. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	19
15. РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ, УКАЗАННЫХ НА КОМПОНЕНТАХ НАБОРА.....	20

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов для полуколичественного иммуноферментного определения содержания специфических IgG-аутоантител к тканевым антигенам в сыворотке крови человека для диагностики ин витро (IgG-Ауто-АТ-ИФА) по ТУ 21.20.23-014-73678649-2017 (далее по тексту - набор, набор «IgG-Ауто-АТ-ИФА») предназначен для определения содержания специфических IgG-аутоантител (IgG-Ауто-АТ) в сыворотке крови человека, направленных к 21 виду тканевых антигенов: основному белку миелина (ОБМ), периферическому белку миелина (ПБМ), миелин-олигодендроцитарному гликопротеину (МОГ), миелин-ассоциированному гликопротеину (МАГ), протеолипидному протеину (ПЛП), миозину (М), рецепторам ацетилхолина (РАХ), белку S100 (S100), дофамину (Д), дофаминовому рецептору (ДР), N-метил-D-аспартат-рецептору (NMDAR), коллагенам III, IV типов (КIII, КIV), энолазе нейронспецифической (NSE), металлопротеиназам (МП), эластину (ЭЛ), эластазе 4 (Э34), нагалазе- α (NAG α), миелопероксидазе (МПО), кератину 5 (К5), аннексину 5 (А5) методом твердофазного иммуноферментного анализа с целью комплексной оценки аутоиммунитета, выявления Ауто-АТ широкого спектра для ранней и специфической диагностики различных аутоиммунных расстройств неврологического и психиатрического характера, церебральных нарушений, ревматоидных воспалительных заболеваний, сердечно-сосудистых изменений, системных поражений соединительных тканей и иммунодефицитов в клинических, диагностических и научно-исследовательских лабораториях.

1.2. Целевой анализ.

Целевым анализом являются специфические IgG-аутоантитела, определяемые в сыворотке крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями (АЗ) различного генеза.

1.3. Специфическое расстройство, состояние и фактор риска, для дифференцирования которых предназначен набор.

Продукция естественных аутоантител, которые специфически взаимодействуют с собственными аутоантигенами и участвуют в регуляции физиологических функций, поддерживается в узких диапазонах концентраций. Если их уровень выходит за физиологические пределы и сохраняется длительное время - это приводит к формированию патологического процесса. Аутоиммунный патологический ответ может быть обусловлен перекрестной реактивностью антигенов некоторых микроорганизмов с аутоантигенными детерминантами хозяина. С другой стороны, хронические вирусные и бактериальные инфекции могут модифицировать собственные антигены хозяина, в результате чего эти аутоантигены распознаются иммунной системой как чужеродные, что способствует неконтролируемому синтезу аутоантител с последующим разрушением клеток и тканей,

несущих эти аутоантигены.

В развитии АЗ факторами риска могут служить наследственная предрасположенность, неблагоприятное воздействие факторов окружающей среды, бактериальная инфекция, нарушение продукции антиидиотипических АТ, контролирующих выраженность и продолжительность иммунного ответа. Сочетание факторов риска может стимулировать пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов и продукцию Ауто-АТ.

1.4. Тип анализируемого образца.

Негемолизованная, прозрачная сыворотка крови человека без консервантов.

1.5. Диагностическая роль.

Аутоантитела, как предвестники аутоиммунных заболеваний, образуются в генетически предрасположенном организме задолго до появления первых симптомов, а раннее выявление специфических Ауто-АТ широкого спектра позволяет получить информацию о характере иммунопатологических нарушений, определить достоверные критерии риска развития, прогноза течения и мониторинга АЗ, а также оценить эффективность терапии в клинической практике.

1.5.1. Ряд аутоиммунных заболеваний центральной и периферической нервной системы (ЦНС и ПНС) выделен в группу демиелинизирующих заболеваний (ДЗ) по признаку деструкции миелина, продуцируемого олигодендроглиоцитами в ЦНС и шванновскими клетками, закрученными вокруг аксона, в ПНС. Миелин обеспечивает прочную изоляцию нейронам и их отросткам, опосредуя иммунологическую толерантность к структурным компонентам ЦНС, а также способствует проведению электрических сигналов и нервных импульсов от тела клетки к иннервируемым органам или другим нервным клеткам. В патогенезе ДЗ (рассеянного склероза, энцефаломиелита, полинейропатии, ретробульбарного неврита, миелопатии и др.) участвуют множественные белки миелина, главные из которых: ОБМ, ПБМ, МОГ, МАГ, ПЛП.

Основной белок миелина (ОБМ) - составляет 30% белков миелина и является главным аутоантигеном в антителообразовании, которое способствует срыву толерантности, запуску демиелинизирующего процесса и развитию прогрессирующих органических поражений ЦНС, главным образом рассеянного склероза (РС).

Периферический белок миелина (ПБМ) - в своем составе содержит специфические белки: ПЛП - до 50%, ОБМ - от 2 до 16%, МОГ - до 5%, МАГ - до 1%. Определение уровня Ауто-АТ к ПБМ является важным показателем при диагностике дегенерации периферических нервов. К заболеваниям, характеризующимся дегенерацией периферических нервных волокон, относится ряд хронических полинейропатий, которые могут быть как наследственными, так и приобретенными (воспалительными или обусловленными сахарным

диабетом, моноклональными гаммапатиями, болезнями обмена веществ и некоторыми хроническими интоксикациями). Диагностика осложняется тем, что многие хронические полинейропатии характеризуются как аксонопатией, так и миелінопатией, и бывает трудно определить, с какого именно из этих поражений началось заболевание.

Миеліно-олигодендроцитарный гликопротеин (МОГ) - чувствительный маркер, более иммуногенный, чем ОБМ, характерен для поздних стадий развития рассеянного склероза (РС), локализован на поверхности олигодендроцитов и является основным серологическим маркером ДЗ. Ауто-АТ к МОГ повреждают миелінон в ЦНС. МОГ играет решающую роль первичного аутоантигена-мишени для аутоиммунных реакций при РС. Аутоантитела к ОБМ и МОГ являются важными диагностическими и прогностическими критериями развития РС. Ауто-АТ против МОГ могут индуцировать развитие экспериментального энцефаломіелита (ЭАЭ) с более выраженной деміелінизацией.

Миеліно-ассоциированный гликопротеин (МАГ) - входит в состав миелінона как в ЦНС, так и в ПНС. МАГ локализован в мембране миеліноной оболочки в периаксональном пространстве и действует как молекула адгезии между аксоном и олигодендроцитом (или шванновской клеткой) в период миелінизации, обеспечивая структурную целостность миеліноной оболочки. Содержание МАГ значительно уменьшается в деміелінизированных областях при РС, в то же время МАГ обнаруживается в макрофагах в очагах деміелінизации, что свидетельствует об его участии в индукции аутоиммунного ответа.

МАГ в ПНС является антигеном - мишенью для циркулирующих АТ при некоторых периферических нейропатиях.

Протеолипидный протеин (ПЛП) - интегральный мембранный белок, проникает через всю толщину мембраны миелінона в ЦНС и ПНС и участвует в формировании компактного миелінона. ПЛП-ген - один из наиболее подверженных мутациям генов миелінона. При этом клинические проявления могут быть разной степени выраженности, но всегда мутации ПЛП-гена характеризуются аутоиммунным ответом с нарушением структуры миелінона.

1.5.2. При аутоиммунных заболеваниях психоневрологического характера определение значительного нарастания уровня специфических IgG-Ауто-АТ в сыворотке крови больных к нейроантигенам тканей мозга может использоваться для ранней диагностики формирующегося патологического процесса в качестве маркера центральных нарушений и повреждений головного мозга.

В патогенезе нейропсихических заболеваний (шизофрения, черепно-мозговые травмы (ЧМТ), инсульты, эпилепсия, арахноидиты, миастения и другие повреждения тканей мозга различного патохимического механизма) важная роль принадлежит ряду нейроантигенов, таких как: М, РАХ, S100, Д, ДР, NMDAR.

Миозин (М) - тканевой аутоантиген, один из главных компонентов соединительных волокон мышц - миофибрилл, составляет 40-60% общего количества мышечных белков. Нарушение иммунных механизмов влияет на нервно-мышечную проводимость, что обуславливает развитие аутоиммунного заболевания нервной системы - миастении. Определение уровня аутоантител к миозину важно также в диагностике и мониторинге терапии миокардитов, обусловленных аллергическими, аутоиммунными заболеваниями и при трансплантации сердца.

Рецепторы ацетилхолина (РАХ) - локализованы в постсинаптической мембране скелетной мускулатуры. Их основная функция состоит в передаче нервного импульса с мембраны на мышечные волокна при связывании с медиатором ацетилхолином. Ауто-АТ к РАХ блокируют связывание ацетилхолина с РАХ и разрушают ряд детерминант в разных местах большой молекулы РАХ, что приводит к мышечной слабости, которая может быть генерализованной и локальной, ограниченной глазодвигательными мышцами. Мониторинг титров Ауто-АТ у конкретного больного может отражать динамику клинического течения заболевания. Ауто-АТ к РАХ отмечаются у 80-90% больных с генерализованной миастенией, 80-90% больных с паранеопластической (тимома-ассоциированной) миастенией, 50% больных с окулярной формой миастении. Выявление высокого уровня ауто-АТ к РАХ является диагностическим признаком для постановки диагноза приобретенной (аутоиммунной) миастении, в основе которой лежит нарушение нервно-мышечного проведения.

Белок S100 (S100) - является специфическим белком астроцитарной глии, способным связывать кальций. Определение ауто-АТ к белку S100 важно использовать в клинике в качестве маркера и прогностического критерия повреждения ткани мозга при развитии ишемического инсульта, нарушениях мозгового кровообращения, болезни Альцгеймера, в мониторинге злокачественной меланомы, спонтанных субарахноидальных кровотечениях, черепно-мозговых травмах, неврологических нарушениях после сердечно-сосудистых операций с искусственным кровообращением и др.

Дофамин (Д) - составляющая часть как головного мозга, так и периферической нервной системы, является нейромедиатором, биохимическим предшественником норадреналина и адреналина. Дофамин содержится в трех участках головного мозга: в контролирующем движения организма, в вызывающем внешние проявления симптомов психического заболевания и в участке, контролирующем гормональный отклик. Первый из этих участков непосредственно связан с возникновением различного рода заболеваний, в частности, болезни Паркинсона. Оценка уровня Ауто-АТ к дофамину, наряду с определением Ауто-АТ к NMDAR и белку S100, является важным показателем.

Дофаминовый рецептор (ДР) - присутствует как в ЦНС, так и в ПНС. Основной эндогенный лигандагонист этих рецепторов - дофамин. ДР участвуют в процессах мотивации, обучения, тонкой моторной координации, модулирования нейроэндокринных сигналов. Они включают пять типов рецепторов: D1, D2, D3, D4 и D5. Изменение дофаминергической функции отмечается в виде неврологических и психических расстройств, а сами рецепторы являются мишенями для множества лекарственных препаратов. Подавляющее большинство антипсихотиков - антагонисты рецепторов дофамина, а психостимуляторы косвенно их активируют. С нарушением дофаминергической системы связывают такие расстройства, как ангедония, депрессия, деменция, патологическая агрессивность, фиксация патологических влечений, синдром персистирующей лактореи-аменореи, импотенция, акромегалия, синдром беспокойных ног и периодических движений в конечностях.

N-метил-D-аспарат-рецептор (NMDAR) - является ионотропным рецептором глутамата, селективно связывающим N-метил-D-аспарат. Предполагается, что глутамат и аспарат в организме выполняют функцию возбудителей, активаторов различных рецепторов, в том числе и NMDAR. Гиперреактивность NMDAR, вызывающая эксайтотоксичность, способствует повышению уровня Ауто-АТ и имеет существенное значение в развитии эпилепсии, деменции, энцефалитов различной этиологии, в патогенезе инсульта и других состояний. Стимуляция NMDAR влечет за собой существенные изменения в головном мозге, однако, избыточная стимуляция может нанести непоправимый вред организму, вплоть до уничтожения нервных клеток.

1.5.3. Практическое применение диагностических маркеров системных заболеваний соединительной ткани позволяет получить объективную информацию о характере иммунопатологических нарушений, оценить активность процесса, тяжесть течения, эффективность терапии и улучшить прогноз при этих сложных многоликих заболеваниях.

Коллагены III и IV типов (KIII и KIV) - являются преобладающими компонентами экстраклеточного матрикса кожи, сухожилий, костной, хрящевой ткани, стромы паренхиматозных органов, базальной мембраны сосудов, почечных клубочков, печени, стенок кишечника и др. Нарушения в синтезе и распаде коллагенов сопровождают многие распространенные АЗ: ревматоидный артрит, полиартрит, склеродермия, системная красная волчанка (СКВ), ревматическая полимиалгия, синдром Шегрена, смешанное заболевание соединительной ткани, повреждения почечных клубочков, почечный фиброз, хроническая почечная недостаточность, ранняя стадия нефропатии.

Энолаза нейронспецифическая (NSE) - гликолитический фермент, обнаруживается преимущественно в нейроэндокринных структурах. Аутоантитела к NSE ассоциированы с

целым рядом расстройств и заболеваний: злокачественные опухоли нейроэндокринного и нейроэктодермального происхождения, доброкачественные заболевания мозга, легких, печени, почек, постишемические повреждения мозга и другие неврологические процессы (эпилепсия, субарахноидальное кровоизлияние).

Металлопротеиназы (МП) - относятся к семейству цинковых металлопротеиназ, функция которых связана с обменом белков межклеточного матрикса. МП играют решающую роль при таких патологических состояниях, как ревматоидный артрит, гломерулонефрит, пародонтиты, изъязвление роговой оболочки глаз и др. Особое место отводится МП в диагностике опухолей и мониторинге противоопухолевой терапии.

Эластин (ЭЛ) - структурный фибриллярный белок соединительной ткани, содержится в больших количествах в легких, коже и др. тканях. ЭЛ имеет важное значение в диагностике системной склеродермии (ССД), системной красной волчанки (СКВ), ревматических заболеваниях. Выявление Ауто-АТ к ЭЛ и КIV типа позволяет диагностировать эмфизему легких, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), болезнь Бюргера (облитерирующий тромбангиит).

Эластаза 4 (ЭЗ4) - протеолитический фермент сока поджелудочной железы, действует на белки соединительной ткани: эластин, коллаген, пептиды. Определение уровня аутоантител к ЭЗ4 применяется при диагностике и мониторинге терапии гранулематоза Вегенера, прогрессирующего гломерулонефрита, ревматоидного артрита, васкулита, неспецифического язвенного колита, первичного склерозирующего холангита, аутоиммунного компонента хронического воспалительного процесса в легочной ткани больных идиопатическим фиброзирующим альвеолитом.

Нагалаза-а (NAGa) - представляет собой белок, обладающий ферментативной активностью. Этот белок продуцируют все клетки злокачественных опухолей, а также инфицированные вирусами клетки (включая ВИЧ, гепатит В, гепатит С, герпес, вирус Эпштейна-Барра). Активность нагалазы приводит к дефициту иммунного ответа, в результате чего неконтролируемо развиваются злокачественные опухоли, а также возрастает уровень активности вирусных инфекций. Определение уровня аутоантител к NAGa является высокочувствительным маркером всех видов онкозаболеваний, позволяет контролировать результаты терапии, а также лечение различных вирусных заболеваний.

Миелопероксидаза (МПО) - это фермент нейтрофилов, необходимый для уничтожения микроорганизмов. Аутоантитела к МПО относятся к группе антинейтрофильных цитоплазматических антител (АНЦА), направленных против различных компонентов нейтрофилов. АНЦА наиболее часто встречаются у пациентов с системными васкулитами, поражающими микрососуды, что может быть использовано для дифференциальной

диагностики АНЦА-васкулитов, характеризующихся вовлечением кожи, суставов, почек, ЖКТ и периферических нервов. Ауто-АТ к МПО также обнаруживаются при других заболеваниях, таких как СКВ, интерстициальный гломерулонефрит, саркоидоз.

Кератин 5 (K5) - относится к семейству фибриллярных белков. Обнаружение Ауто-АТ к K5 является высокоспецифичным тестом для ранней диагностики ревматоидного артрита, ряда заболеваний, включающих базальный тип рака молочной железы и плоскоклеточного рака легкого, мезотелиомы, что может быть использовано для дифференциальной диагностики и выявления метастазов в базальных клетках.

Аннексин 5 (A5) - обнаруживается в эндотелии сосудов и синцитиальном слое трофобластов, отличается способностью связывать молекулы фосфатидилсерина, являясь естественным антикоагулянтом. Наличие в крови антител к A5 нарушает этот защитный механизм, что проявляется тенденцией к тромбозам и развитию антифосфолипидного синдрома (АФС). Уровень Ауто-АТ к A5 может быть повышен у пациентов с СКВ, воспалительными ревматоидными заболеваниями.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. В состав набора входят следующие компоненты:

- планшет полистироловый 96-луночный разборный, готовый к применению - 1 шт.

Планшет состоит из:

- двух 8-луночных стрипов, покрытых моноклональными анти-IgG-антителами (МКАТ анти-IgG) - референс-стрипы, маркированы **P1**;

- десяти 8-луночных стрипов, покрытых тканевыми антигенами (таблица 1);¹

- калибровочные пробы (КП) на основе сыворотки крови плодов коровы (жидкой) с использованием препарата IgG человека, содержащие известные количества IgG в мкг/мл: 50 (КП_А), 20 (КП_В), 10 (КП_С), 2 (КП_Д), 0 (КП_Е). Калибровочные пробы аттестованы по Второму международному стандарту IgG человека IRP 67/86, маркированы **P23**, готовы к применению - 5 флаконов (по 0,07 мл);

- конъюгат МКАТ анти-IgG-человека с пероксидазой хрена, 100-кратный концентрат, маркирован **P24** - 1 флакон (0,15 мл);

- буферный раствор, 10-кратный концентрат, маркирован **P25** - 1 флакон (30 мл);

- тетраметилбензидин (ТМБ), маркирован **P26**, готовый к применению - 1 флакон (22 мл);

¹ - перечень и комплектация тестируемых тканевых антигенов определяются по согласованию с потребителем.

**Перечень тканевых рекомбинантных антигенов,
предоставляемых производителем**

Маркировка	Сокращенное наименование	Полное наименование
P2	ОБМ	основной белок миелина
P3	ПБМ	периферический белок миелина
P4	МОГ	миелин-олигодендроцитарный гликопротеин
P5	МАГ	миелин-ассоциированный гликопротеин
P6	ПЛП	протеолипидный протеин
P7	М	миозин
P8	РАХ	рецепторы ацетилхолина
P9	S100	белок S100
P10	Д	дофамин
P11	ДР	дофаминовый рецептор
P12	NMDAR	N-метил-D-аспартат-рецептор
P13	KIII	коллаген III типа
P14	KIV	коллаген IV типа
P15	NSE	энолаза нейронспецифическая
P16	МП	металлопротеиназы
P17	ЭЛ	эластин
P18	ЭЗ4	эластаза 4
P19	NAG α	нагалаза- α
P20	МПО	миелопероксидаза
P21	K5	кератин 5
P22	A5	аннексин 5

- стоп-реагент (1N раствор серной кислоты), маркирован **P27**, готовый к применению - 1 флакон (6 мл);

- липкая пленка в виде отдельных листов для заклейки планшетов (далее по тексту - защитная пленка) - 2 шт.;

- трафарет для анализа - 1 шт.;

- инструкция по применению - 1 шт.

2.2. Набор рассчитан на определение содержания IgG-Ауто-АТ в 80 образцах сыворотки крови относительно 5 образцов калибровочных проб в дублях (всего 90 определений).

2.3. Принцип действия - твердофазный неконкурентный непрямой иммуноферментный анализ. В наборе использованы 2 вида моноклональных анти-IgG-антител, одни из которых используются для покрытия референс-стрипов в полистироловом наборном 96-луночном планшете, вторые - входят в состав пероксидазного конъюгата. Во время первой инкубации происходит связывание специфических IgG-Ауто-АТ, содержащихся в исследуемых образцах сывороток крови, с иммобилизованными на поверхности лунок стрипов тканевыми антигенами. На втором этапе, при промывке, удаляются неспецифические IgG-Ауто-АТ.

После удаления содержимого лунок и внесения в них раствора пероксидазного конъюгата происходит сорбция молекул конъюгата в количестве, прямо пропорциональном количеству связавшихся аутоантител. После удаления избытка несвязавшегося конъюгата проводится ферментативная реакция пероксидазы с субстратом - перекисью водорода в присутствии хромогена (ТМБ).

Продукт реакции разложения субстрата превращает молекулы хромогена в окрашенное соединение голубого цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию специфических IgG-Ауто-АТ к идентифицированным тканевым антигенам в исследуемых образцах. После остановки ферментативной реакции стоп-реагентом (раствор H_2SO_4) цвет реакции меняется на желтый. Концентрация специфических IgG-Ауто-АТ пропорциональна интенсивности окрашивания.

Результаты анализа регистрируют с помощью фотометра вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Расчет результатов уровня определяемых специфических IgG-Ауто-АТ в пробах проводится на основании калибровочного графика, построенного по референсным точкам КП и выражается в мкг/мл.

2.4. Время проведения анализа - 2,5 часа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

3.1. Специфичность набора.

В наборе «IgG-Ауто-АТ-ИФА» используются моноклональные антитела против гамма-цепи (γ) Ig человека, продукты клонов 21G (5A9 и 21G), 4D6, обладающие высокой специфичностью к IgG. Перекрестного связывания с другими классами иммуноглобулинов (IgM, IgA, IgE) или альбумином в физиологических концентрациях не наблюдалось. Аналитическая специфичность составляет 99%.

3.2. Чувствительность определения.

Минимальная, достоверно определяемая набором, концентрация IgG-Ауто-АТ, при которой можно обнаружить в ИФА-реакции различие в оптической плотности между калибровочной пробой (КПД) с низким уровнем IgG и калибровочной пробой, не содержащей IgG (КПЕ), составляет не более 2 мкг/мл.

3.3. Воспроизводимость - способность набора давать близкие друг к другу результаты при многократных испытаниях сывороток, содержащих специфические IgG-Ауто-АТ к антигенам, входящим в состав набора, проведенных в разных лабораториях, разными специалистами на различном оборудовании.

Воспроизводимость выражается коэффициентом вариации (КВ) и не превышает 8%.

3.4. Диапазон определяемых концентраций IgG-Ауто-АТ составляет 2-50 мкг/мл.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.

4.1. Потенциальный риск применения набора - класс 2а.

4.2. Набор предназначен для использования квалифицированным персоналом, обученным в области лабораторной диагностики.

4.3. Все компоненты набора в используемых концентрациях, за исключением стоп-реагента (1N раствор серной кислоты), являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. В случае попадания стоп-реагента на кожу или слизистые покровы следует промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.4. Образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или возбудитель любой другой инфекции, поэтому, при работе с анализируемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, правила безопасности при проведении анализов,² четкое выполнение процедур исследования и указаний инструкции по применению набора.

5. ПЕРЕЧЕНЬ РИСКОВ, СВЯЗАННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАБОРА, И ПУТИ ИХ СНИЖЕНИЯ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ДОСТОВЕРНОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА.

5.1. Предупреждение рисков (ошибок) преаналитического этапа.

Рисками преаналитического этапа являются: подготовка пациента, отбор анализируемого материала, идентификация проб и их первичная обработка, использование консервантов, транспортировка и хранение исследуемых образцов до проведения анализа:

- взятие венозной крови производится натощак, в утренние часы с использованием одноразовых пластиковых систем (вакутейнеров), состоящих из контейнеров с навинчивающимися на них одноразовыми иглами и пробирок с плотно прилегающими пробками и вакуумом внутри или одноразовых шприцев с подходящим диаметром иглы (0,55-0,65 мм), чтобы избежать повреждения эритроцитов и последующего гемолиза, который ведет к ложноположительному результату;

- для получения сыворотки венозную кровь отстаивают при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 30 минут до полного образования сгустка. Далее пробы центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 минут, отделяют сыворотку и помещают ее в транспортную химическую или центрифужную пробирку;

² - ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», с учетом требований МУ-287-113 «Методических указаний по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. Департаментом госсанэпиднадзора Минздрава России 30.12.1998 г., а также «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утв. Минздравом СССР 17.01.1991 г.

- правильно собранный биоматериал должен быть своевременно доставлен в лабораторию. Если доставка биоматериала в лабораторию осуществляется в течение дня, то он хранится при температуре 2-8 °С (в холодильнике) и далее, в специальных транспортных контейнерах доставляется в лабораторию;

- рабочие поверхности столов, оборудования перед проведением анализа обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускать использование перекиси водорода и хлорсодержащих растворов).

5.2. Предупреждение рисков (ошибок) аналитического этапа.

Процедуру аналитического этапа должен выполнять специально обученный персонал клинико-диагностической лаборатории, соблюдая:

- правила безопасности при проведении анализов;

- правила ведения документации;

- четкое выполнение процедур исследования и указаний инструкции по применению набора;

- запрет на проведение анализов в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые меняют ферментативную активность конъюгатов;

- тщательность промывки лунок планшета и работы с дозаторами.

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

- фотометр планшетный, вертикального сканирования, включающий фильтр с длиной волны 450 нм, предназначенный для качественной или количественной оценки результатов иммуноферментного анализа - «Униплан», «Мультискан» или иного типа с теми же характеристиками;

- пипетки полуавтоматические одноканальные и многоканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 10 до 300 мкл (погрешность не более 5%);

- шейкер;

- термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °С;

- холодильник бытовой;

- центрифуга лабораторная «Элми СМ6М» или другого типа с аналогичными характеристиками;

- цилиндры мерные;

- микропробирки или микропланшет для предварительного разведения образцов;

- бумага фильтровальная лабораторная;

- пластиковые ванночки для реагентов;

- перчатки медицинские одноразовые;
- вода очищенная;
- дезинфицирующее средство на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

7.1. Негемолизированная прозрачная сыворотка крови человека без консервантов.

7.2. Анализируемые образцы можно хранить при температуре 2-8 °С не более 5 дней при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре -20 °С и ниже не более 3 месяцев. Повторное замораживание образцов не допускается.

7.3. Если анализ не может быть проведен в течение 5 дней, образцы следует заморозить. После размораживания образцы тщательно перемешать, осадок отделить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 10 минут при температуре 18-25 °С.

Работа на центрифуге осуществляется согласно инструкции к прибору.

8. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

8.1. Перед проведением анализа извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты³ при комнатной температуре (18-25 °С) в течение времени не менее 30 минут.

8.2. Составить схему расположения анализируемых образцов на трафарете, входящем в состав набора (схема 1).

Схема 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КПА	КПА	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
B	КПВ	КПВ	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
C	КПС	КПС	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
D	КПД	КПД	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
E	КПЕ	КПЕ	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
F			∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
G			∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
H			∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	РЕФЕРЕНС-СИСТЕМА		СТРИПЫ, СОРБИРОВАННЫЕ ТКАНЕВЫМИ АНТИГЕНАМИ									

∅ - образцы сывороток.

³ - запрещается использовать реагенты из наборов разных серий или наборов других производителей!

8.3. Приготовление рабочего буферного раствора.

Содержимое флакона **P25** поместить в мерный цилиндр, довести до объема 300 мл очищенной водой и тщательно перемешать. Рабочий буферный раствор можно хранить при температуре 2-8 °С не более 5 суток.

8.4. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Встряхнуть флакон с конъюгатом так, чтобы капли раствора со стенок и крышки опустились на дно. В мерный цилиндр поместить 0,1 мл содержимого флакона **P24**, довести до 10 мл рабочим буферным раствором (п. 8.3.) и перемешать с использованием шейкера. Готовить не более чем за 30 минут до использования!

8.5. Подготовка анализируемых проб сывороток.

Перед анализом образцы сывороток выдержать при комнатной температуре (18-25 °С) не менее 30 минут, затем перемешать осторожным переворачиванием пробирки и развести образцы проб с помощью микропланшета (микропробирки) в 10 раз рабочим буферным раствором (например: 10 мкл образца + 90 мкл рабочего буферного раствора).

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

9.1. Во все лунки планшета, обозначенные на схеме 1, с помощью многоканальной пипетки внести по 90 мкл рабочего буферного раствора (п. 8.3.).

9.2. Встряхнуть флаконы с калибровочными пробами так, чтобы капли растворов со стенок и крышки опустились на дно.

9.3. В лунки А-Е первого и второго ряда планшета внести по 10 мкл калибровочных проб в дублях КП_А, КП_В, КП_С, КП_Д, КП_Е.

9.4. В лунки А-Н с третьего по двенадцатый ряды планшета (схема 1) внести по 10 мкл подготовленных образцов сывороток (п. 8.5.).

ВНИМАНИЕ: использовать только одноразовые наконечники для каждого образца!

9.5. Время внесения калибровочных проб и образцов сывороток в лунки планшета не должно превышать 10 мин. Время инкубации необходимо исчислять от момента внесения реагента в последнюю лунку.

9.6. Закрыть планшет защитной пленкой и перемешать его содержимое встряхиванием на шейкере или осторожным постукиванием по рамке в течение 20-30 секунд, после чего инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 1 часа.

9.7. По окончании инкубации снять защитную пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим средством. Удалить жидкость из лунок планшета путем стряхивания в сосуд с дезинфицирующим средством, после чего добавить во все лунки планшета по 150 мкл рабочего буферного раствора и через 20-30 секунд удалить жидкость путем стряхивания.

Процедуру промывки повторить еще 2 раза. Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями.

9.7.1. При наличии промывочного устройства (вошера) использовать его для промывки лунок планшета, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок.

После окончания последней промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

9.8. Внести во все лунки планшета по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 8.4.).

ВНИМАНИЕ: для внесения раствора конъюгата использовать только одноразовые наконечники!

Закрыть планшет защитной пленкой и инкубировать при температуре 37 °С в течение 1 часа. По окончании инкубации удалить жидкость из лунок путем стряхивания. Промыть лунки планшета так, как это указано в п. 9.7., после чего дополнительно промыть лунки планшета очищенной водой (по 150 мкл) 2 раза.

После окончания последней промывки удалить следы жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом состоянии по фильтровальной бумаге.

9.9. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ (P26).

ВНИМАНИЕ: для внесения ТМБ использовать только одноразовые наконечники!

Инкубировать в течение 10-20 минут (в зависимости от степени голубого окрашивания) **в темном месте** при комнатной температуре 18-25 °С.

Контролировать время реакции: после внесения ТМБ наблюдать за изменением цвета в лунках планшета каждые 3-5 минут. Если окрашивание слишком интенсивно развивается, во избежание получения неточных результатов остановить реакцию добавлением стоп-реагента.

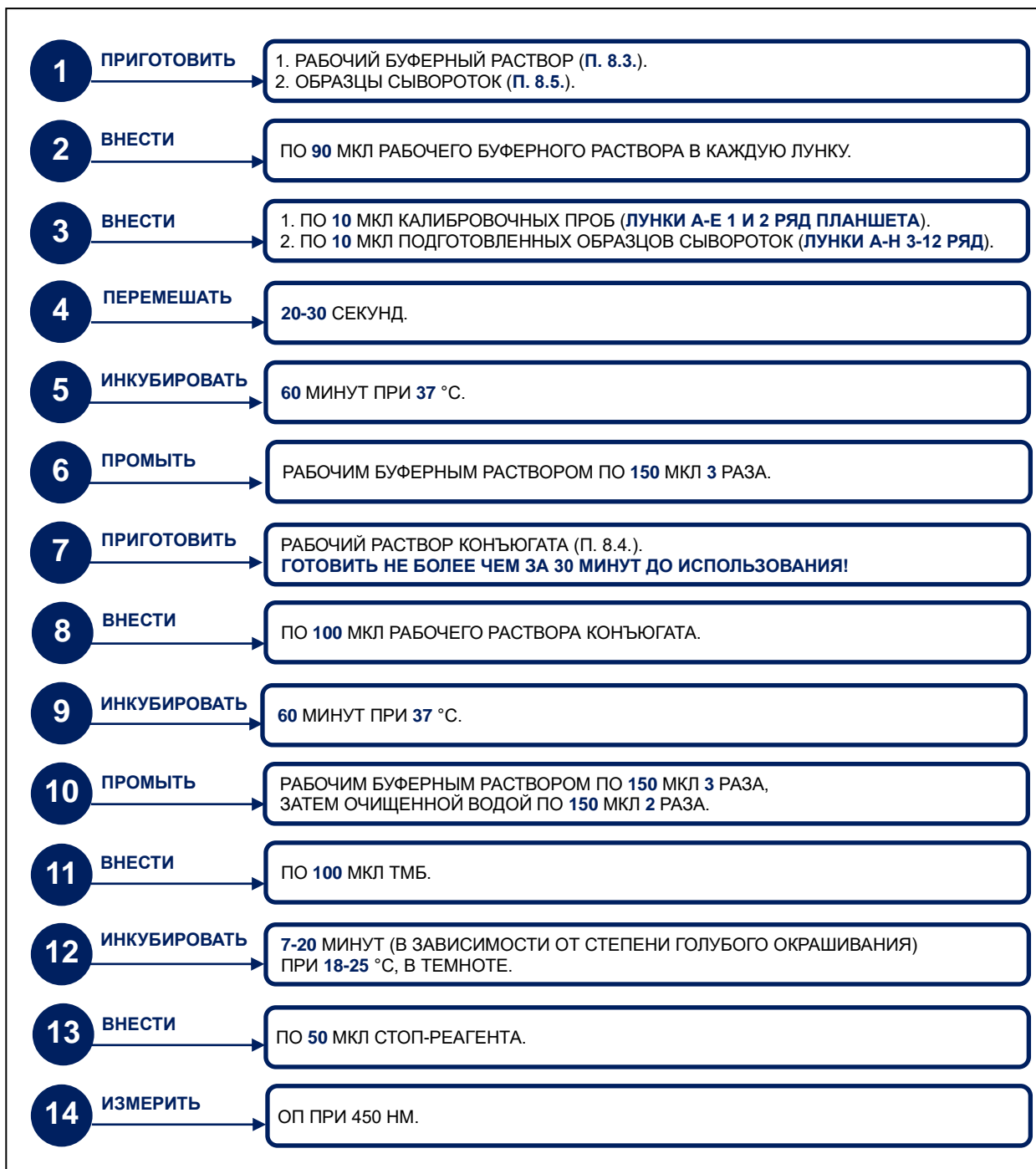
9.10. Остатки ТМБ утилизировать (п. 13.2.), **не сливать обратно во флакон!**

9.11. По окончании инкубации добавить во все лунки по 50 мкл стоп-реагента (P27), при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

9.12. Измерить оптическую плотность (ОП) растворов в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 минут.

10. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!



11. РАСЧЕТЫ.

11.1. Оптическая плотность калибровочной пробы $KП_A$ должна быть не менее значения указанного в паспорте качества.

11.2. При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в фотометр программного обеспечения, в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

11.3. При ручных расчетах для получения стандартной кривой построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс рабочую концентрацию IgG в мкг/мл, по оси ординат - оптическую плотность при длине волны 450 нм.

11.4. Оценку полученных значений уровней специфических IgG-Ауто-АТ в мкг/мл рекомендуется интерпретировать согласно таблице 2.

Таблица 2.

Концентрация специфических IgG, мкг/мл	Класс	Интерпретация значений
>50		чрезвычайно высокий уровень
20-50	4	очень высокий уровень
10-20	3	высокий уровень
2-10	2	средний уровень
0-2	1	низкий уровень
0	0	отрицательный результат

11.5. Полученные результаты должны оцениваться врачом в комплексе с клинико-анамнестическими данными, с учетом клинических показателей и других диагностических процедур.

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

12.1. Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры. Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 5 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

12.2. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре 2-8 °С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 5 суток.

12.3. При транспортировании, осуществлении погрузки и выгрузки наборов должны быть приняты меры, предохраняющие тару от механических повреждений, воздействия атмосферных осадков, горючих материалов и кислот.

Допускаются механические воздействия в течение 5 суток: вибрационные нагрузки в диапазоне частот 10-55 Гц, амплитуда перемещения 0,35 мм; ударные нагрузки (пиковое ударное ускорение) м/с² (g) - 100 (10), длительность действия ударного ускорения - 16 мс.

13. УНИЧТОЖЕНИЕ И УТИЛИЗАЦИЯ НАБОРА.

13.1. Наборы реагентов с истекшим сроком годности подлежат уничтожению.

13.2. Жидкие компоненты (реагенты) уничтожаются вскрытием внутренней упаковки с последующим разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как бытовой мусор.

13.3. Принадлежности, входящие в комплектацию набора, подлежат механическому разрушению с вывозом остатков как бытовой мусор, или сжиганию.

13.4. Персонал, осуществляющий уничтожение набора, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.







14. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ.

14.1. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

14.2. Срок годности набора - 6 месяцев со дня приемки ОБТК предприятия-изготовителя. По истечении срока годности набор применению не подлежит.

14.3. По вопросам качества набора следует обращаться в ООО НПО «Иммунотэкс», по адресу: 355014, Россия, г. Ставрополь, ул. Доваторцев, д. 177Г, стр.1, тел./факс: +7(8652) 28-34-60, e-mail: market@immunotex.ru.

15. РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ, УКАЗАННЫХ НА КОМПОНЕНТАХ НАБОРА.

Символ	Значение символа
	Дата изготовления.
	Годеи до.
	Номер серии.
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i> .
	Обратитесь к инструкции по применению.
	Температурный диапазон хранения.