

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов тест-системы иммуноферментной для выявления иммуноглобулинов класса G к циклическим цитруллинированным пептидам «АЦЦП-ИФА-IgG»

Настоящая инструкция по применению распространяется на тест-систему иммуноферментную «АЦЦП-ИФА-IgG», (далее по тексту – набор), представляющую собой набор реагентов для выявления антител класса G к композиции циклических цитруллинированных пептидов в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Комплект набора рассчитан на одновременное определение 48 образцов в дублях, включая контрольные.

## Состав набора

№	Компонент	Цвет раствора	Фасовка	Маркировка
1	Микропланшет с сорбированной в лунках смесью антигенов. 12 стрипов в рамке, возможность дробного использования лунок, готов к использованию.	---	12x8	Иммунсорбент
2	Калибратор 1,2,3,4 и 5 0, 10, 20, 100, 200 ОЕ/мл (IgG человека, инактивированные), готов к использованию	красный	5 x 1 мл	Калибратор
3	Положительный контрольный образец (IgG человека, инактивированный, готов к использованию)	красный	1x 1 мл	K+
4	Отрицательный контроль образец (IgG человека, инактивированный, готов к использованию)	зеленый	1x 1 мл	K-
5	Буфер для инкубации сывороток. Готов к использованию.	синий	2 x 50 мл	БИС
6	ФСБ-Т (20 x концентрат)	бесцветный	1 x 40 мл	ФСБ-Т
7	Раствор конъюгата–антитела мыши к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. Готов к использованию.	желтый	1 x 12 мл	PK, IgG
8	Раствор хромогена – однокомпонентный раствор ТМБ (3, 3', 5, 5' – тетраметилбензидина). Готов к использованию.	бесцветный	1 x 11 мл	ТМБ
9	Стоп-реагент (2N соляная кислота)	бесцветный	1 x 12 мл	Стоп-реагент
10	Пленка для инкубации планшетов	---	1шт.	---
11	Емкости для жидких компонентов	---	2 шт.	Емкости для жидких компонентов
12	Инструкция по применению	---	1 шт.	---

## Состав набора (подробный):

- «Иммунсорбент» - 96-луночные полистироловые или полихлорвиниловые разборные планшеты для иммунологических реакций, в лунках которых сорбирована смесь циклических цитруллинированных пептидов - 1 планшет (12x8 лунок);
- Калибратор 1,2,3,4,5 – раствор, содержащий антитела класса G к ЦЦП в соответствующих концентрациях (1 - 0ед/мл, 2 - 10ед/мл, 3 - 20ед/мл, 4 - 100ед/мл, 5 - 200ед/мл), не содержащий HBsAg, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к гепатиту С, к *Treponema pallidum.*, прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость; готов к использованию - 5фл. x 1мл;
- «K+» - положительный контрольный образец - сыворотка крови человека, в разведении 1:100, инактивированная, содержащая антитела класса G к циклическим цитруллинированным пептидам, не содержащая HBsAg, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к гепатиту С, к *Treponema pallidum.*, прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость; - 1 флакон (1мл);
- «K-» – отрицательный контрольный образец - сыворотка крови человека в разведении 1:100, не содержащая антител к циклическим цитруллинированным пептидам, не содержащая HBsAg, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к гепатиту С, к *Treponema pallidum.*, инактивированная, прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость зеленого цвета – 1 флакон (по 1 мл);
- примечание: Все образцы сывороток крови человека входящие в состав K+ и K- тестированы на отсутствие антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антиген р24 ВИЧ-1, антител к гепатиту С, антител к HBsAg тест-системами, зарегистрированными на территории РФ.
- «БИС» – буфер для инкубации сывороток, прозрачная жидкость синего цвета – 2 флакона (по 50,0 мл);
- «ФСБ-Т» (20 x концентрат) - прозрачная слегка опалесцирующая пенящаяся жидкость, допускается выпадение кристаллического осадка белого цвета, растворяющегося при температуре +37°С в течение 30 мин, требует предварительного разведения (см. Приготовление реагентов) – 1 флакон (40,0 мл);
- «PK, IgG» – раствор конъюгата– моноклональные мышиные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; прозрачная желтого цвета жидкость, готов к использованию – 1 флакон (12,0 мл);
- «ТМБ» – однокомпонентный раствор хромогена и субстрата– 3, 3', 5, 5' - тетраметилбензидин (ТМБ), прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, готов к использованию – 1 флакон ( 11,0 мл);
- «Стоп-реагент» (2N соляная кислота), прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию - 1 флакон (12,0 мл);

## Меры предосторожности

Все компоненты набора, за исключением стоп реагента, в состав которого входит соляная кислота, в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Стоп-реагент, содержащий соляную кислоту, действует на кожу и слизистые, вызывая раздражение и ожоги, поэтому в случае попадания на кожные или слизистые покровы ее следует немедленно и тщательно смыть большим количеством проточной воды.

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

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатитов и другие возбудители вирусных и других гемотрансмиссивных инфекций.

При утилизации контрольных сывороток и тестируемых образцов необходимо руководствоваться утвержденными правилами работы с инфекционным материалом.

При проведении анализа категорически запрещается использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов.

#### **Оборудование, реагенты и материалы:**

- Фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- автоматический промыватель планшетов (вошер);
- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру +37°C, или планшетный шейкер-термостат на температуру +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 50 - 200 мкл и 200 – 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 50-300 мкл;
- ванночки для реагентов;
- таймер;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые;
- вода дистиллированная
- мерные емкости (0,5 л);

#### **Анализируемые образцы**

Для анализа используют образцы сыворотки или плазмы крови человека, подготовленные стандартным образом.

#### **ВНИМАНИЕ!**

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы сывороток хранят при температуре от +2 °С до +8 °С не более 10 суток, для длительного хранения замораживают и хранят при температуре не выше -20°C, избегая многократного замораживания-оттаивания. Пробы, содержащие агрегаты или осадок, осветляют центрифугированием. Образцы сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным проростом тестированию не подлежат.

#### **Приготовление реагентов**

##### **Рабочий раствор ФСБ-Т**

Содержимое одного флакона 20 x концентрата ФСБ-Т перенести в мерный цилиндр и довести объем раствора до 800 мл дистиллированной водой. При наличии во флаконе с концентратом ФСБ-Т осадка солей, необходимо предварительно подогреть его при температуре (37±1) °С до полного их растворения.

Хранение: рабочий раствор ФСБ-Т хранить не более 1 мес при температуре от +2 °С до +8 °С.

#### **Предварительное разведение исследуемых сывороток.**

Образцы исследуемых сывороток разводят 1:101 в БИС. Для этого смешивают 10 мкл каждой сыворотки с 1 мл БИС.

Хранение: разведенные образцы исследуемых сывороток хранению не подлежат.

#### **Проведение иммуноферментного анализа**

**Подготовка к анализу**

Выдержать все компоненты набора и анализируемые образцы при комнатной температуре (+18 ...+25 °С) 30 мин.

Установить в рамке планшета необходимое количество стрипов.

Неиспользованные стрипы хранить только в герметично закрытом пакете при температуре от +2°C до +8°C не более 1 мес. с момента вскрытия пакета «Иммуносорбент».

**Внесение образцов, контролей и калибратора****Схема внесения образцов и контролей**

	Качественный анализ				Количественный анализ			
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Калибр 2	Калибр 2	S6	S6	Калибр 1	Калибр 1	S2	S2
B	K+	K+	S7	S7	Калибр 2	Калибр 2	S3	S3
C	K-	K-	S8	S8	Калибр 3	Калибр 3	S4	S4
D	S1	S1	S9	S9	Калибр 4	Калибр 4	S5	S5
E	S2	S2	S10	S10	Калибр 5	Калибр 5	S6	S6
F	S3	S3	S11	S11	K+	K+	S7	S7
G	S4	S4	S12	S12	K-	K-	S8	S8
H	S5	S5	S13	S13	S1	S1	S9	S9

Схема внесения образцов иллюстрирует:

- в колонках 1-4 – качественное определение антител в 13 образцах пациентов (от S1 до S13).
- в колонках 5-8 – количественное определение антител в 9 образцах пациентов (от S1 до S9).

Дублирование образцов позволяет увеличивать достоверность получаемых результатов анализа.

В соответствующие лунки планшета внести по 100 мкл K+, K-, Калибратора и предварительно разведенных исследуемых сывороток.

**Инкубация образцов (1 этап)**

После этого планшет следует закрепить клейкой лентой и инкубировать 60 мин при (37±1) °С на термошейкере при скорости встряхивания платформы 500 об/мин или в термостате при температуре (37±1) °С.

**Промывка**

По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т три раза следующим образом:

- удалить содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором;
- в каждую лунку внести по 300 мкл промывочного буфера, перемешать в течение 10 сек на шейкере;
- удалить содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором;
- тщательно удалить остатки влаги из планшета;

**Инкубация конъюгата (2 этап)**

После промывки и удаления влаги в каждую лунку внести по 100 мкл РК, IgG. Планшет закрыть, как описано выше, и инкубировать 30 мин при (37±1) °С на шейкере при скорости встряхивания платформы 500 об/мин или в термостате при температуре (37±1) °С без встряхивания.

**Промывка**

По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т три раза.

**Инкубация с хромогеном (3 этап)**

Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл ТМБ. Планшет инкубировать 10 мин при (37±1) °С на шейкере при скорости встряхивания платформы 500 об/мин или в термостате при температуре (37±1) °С без встряхивания.

**Остановка реакции**

Реакцию остановить внесением в каждую лунку по 100 мкл Стоп-реагента, добейтесь гомогенности полученной смеси.

**Учет результатов**

Измерение проводят спектрофотометрически при длине волны **450 нм** немедленно после внесения Стоп-реагента. Нулевой уровень (бланк) устанавливается по воздуху.

Результаты учитывают только в том случае, если :

- в лунках с К- среднее значение ОП  $\leq 0,2$ ;
- в лунках с К+ среднее значение ОП  $\geq 0,8$ .

#### Качественный/полуколичественный анализ

Результаты можно оценивать полуколичественно, рассчитывая коэффициент серопозитивности (КС) в лунке с контрольным образцом или в лунке с образцом пациента. Для расчета этого отношения используйте следующую формулу:

$$КС = \frac{\text{ОП контрольного образца или ОП исследуемой сыворотки}}{\text{ОП калибратора 2}}$$

#### Интерпретация результатов:

1.	КС образца < 0,9	<b>Отрицательный результат.</b> Указывает, что тестируемый образец либо не содержит антител класса G к циклическим цитруллинированным пептидам, либо содержит не детектируемый уровень антител.
2.	$0,9 \leq \text{КС образца} \leq 1,1$	<b>Сомнительный результат «серая зона».</b> Повторить анализ. Если повторное исследование показало сомнительный результат, рекомендуется провести дополнительное исследование нового образца сыворотки через 4-6 недель.
3.	КС образца > 1,1	<b>Положительный результат.</b> Указывает, что тестируемый образец содержит антитела класса G к циклическим цитруллинированным пептидам. Величина КС отражает относительную концентрацию специфических антител.

#### Количественный анализ

На графике откладывают величины ОП, измеренные для 5 калибровочных образцов (линейная ось Y) и известные концентрации антител к ЦЦП в этих образцах, выраженных в относительных единицах Ед/мл (линейная ось X). По полученным точкам строят калибровочную кривую для определения концентрации специфических антител к ЦЦП. Для обсчета кривой с помощью компьютера используйте любой из способов построения, например кусочно-линейная интерполяция. Если ОП образца превышает ОП калибратора 5 (с концентрацией 200 Ед/мл), результат следует интерпретировать как ">200 Ед/мл". Подобные образцы рекомендуется развести дополнительно в 10 раз буфером «БИС» и протестировать повторно, а результат полученный по калибровочной кривой (в Ед/мл), умножить на коэффициент разведения 10. Верхняя граница интервала нормальных значений составляет 10 Ед/мл.

Значение концентрации специфических антител к ЦЦП образца интерпретируется следующим образом:

$\leq 10$  Ед/мл: отрицательный результат

$> 10$  Ед/мл: положительный результат

#### Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность определяется как 3-х кратное стандартное отклонение образца, не содержащего определяемого аналита, и представляет собой наименьший определяемый титр антител. Аналитическая чувствительность набора реагентов АЦЦП-ИФА-IgG составляет 0,3 Ед/мл.

#### Срок годности

Срок годности набора – 9 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

#### Условия транспортировки и хранения

Транспортирование наборов реагентов должно производиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от +2 °С до +8 °С. Допустимо транспортирование от +9 до +20 °С не более 7 сут. Замораживание не допускается.

Набор реагентов должен храниться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 в сухом, защищенном от света месте при температуре от +2 °С до +8 °С. Хранить в недоступном для детей месте.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов «АЦЦП-ИФА-IgG» следует обращаться в центральный офис ООО «Омникс» 197376, г.Санкт-Петербург, наб. реки Карповки, д.5, корп. 14, тел/факс: (812) 336-41-87, 336-41-97, 294-64-35. e-mail: [info@omnix.ru](mailto:info@omnix.ru)

