

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН
НИИ эпидемиологии и
микробиологии имени Пастера



А.А. Тотолян

«13» июля 2025 г.

Дата выдачи документа
«13» июля 2025 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению Набора реагентов для иммуноферментного качественного
определения антител человека классов IgM, IgA и IgG к холерным антигенам
(Анти-АГ–Vibrio cholerae PS)**

Оглавление

	Стр.
1. Общие сведения.....	3
2. Назначение медицинского изделия.....	3
2.1. Предназначение для клинической лабораторной диагностики.....	3
2.2. Потенциальные потребители.....	3
2.3. Целевой анализ.....	3
2.4. Специфическое расстройство, состояние для обнаружения, определения которого предназначено медицинское изделие.....	3
2.5. Тип анализируемого образца.....	4
2.6. Принцип качественного аналитического метода исследования.....	4
3. Риски применения медицинского изделия, противопоказания, связанные с применением медицинского изделия по назначению.....	5
3.1. Потенциальный риск применения.....	5
3.2. Прямой риск применения.....	5
3.3. Косвенный риск применения.....	5
3.4. Особые указания.....	5
4. Технические характеристики медицинского изделия.....	5
4.1. Состав медицинского изделия.....	6
4.2. Внешний вид медицинского изделия.....	7
5. Характеристики аналитической эффективности медицинского изделия.....	10
6. Меры предосторожности.....	12
7. Анализируемые образцы.....	13
8. Требуемое дополнительное оборудование и материалы.....	14
9. Проведение исследования.....	15
9.1. Подготовка реагентов.....	15
9.2. Проведение иммуноферментного анализа.....	17
9.3. Учет и интерпретация результатов.....	21
10. Утилизация.....	21
11. Условия транспортирования и хранения.....	22
12. Срок годности медицинского изделия.....	22
13. Объяснение используемых символов.....	22
14. Рекламации.....	24

1. Общие сведения

Настоящая инструкция содержит информацию, необходимую для правильного и безопасного применения медицинского изделия (далее по тексту – Набор реагентов или МИ) для *in vitro* диагностики «Набор реагентов для иммуноферментного качественного определения антител человека классов IgM, IgA и IgG к холерным антигенам (Анти-АГ–*Vibrio cholerae* PS)», разработанного и произведенного Федеральным бюджетным учреждением науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

Адрес: 197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

Телефон:(812)233-20-92, факс: (812) 644-63-10, электронный адрес: pasteur@pasteurorg.ru, официальный веб-сайт: <https://pasteurorg.ru>.

2. Назначение медицинского изделия

Набор реагентов предназначен для определения антител классов IgM, IgA и IgG к холерным антигенам (субъединица В холерного токсина или О-антиген) в образцах плазмы или сыворотки крови человека методом качественного иммуноферментного анализа для оценки уровня гуморального иммунного ответа у лиц, переболевших холерой или после вакцинации против холеры.

2.1. Набор реагентов предназначен для клинической лабораторной диагностики

2.2. Потенциальные потребители

Потенциальными потребителями МИ являются специалисты учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также специалисты научно-исследовательских, медицинских организаций, клиничко-диагностических лабораторий, осуществляющих лабораторную диагностику гуморального иммунитета к холере.

К работе с Набором реагентов допускаются только специалисты, обученные методам иммуноферментного анализа и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории (СанПиН 3.3686-21 «Требования по профилактике инфекционных болезней»).

2.3. Целевой анализ

Целевым анализом являются антитела классов IgM, IgA и IgG в образцах плазмы (ЭДТА) или сыворотки крови человека к антигенам *Vibrio cholerae* (субъединица В холерного токсина и О-антиген) качественного вида.

2.4. Специфическое расстройство, состояние, для обнаружения, определения которого предназначено медицинское изделие

Холера – острая кишечная, антропонозная инфекция, характеризующаяся фекально-оральным путем заражения, поражением тонкого кишечника, сопровождающимся водянистой диареей, рвотой, потерей организмом жидкости и электролитов с развитием различной степени обезвоживания организма.

Возбудителем холеры являются холерные вибрионы *Vibrio cholerae*, принадлежащие к двум серогруппам O1 и O139, характеризующиеся продукцией холерного токсина, который является причиной интенсивного обезвоживания после начала активной фазы холерной инфекции.

Диагностика холеры осуществляется на основе клинической картины, данных эпидемиологического анализа, а также микробиологических исследований биологических образцов (испражнения, рвотные массы), ПЦР-анализа ДНК *Vibrio cholerae* и определения агглютининов и вибриоцидных антител в образцах сыворотки и плазмы крови.

Присутствие антител к антигенам бактерий *Vibrio cholerae* классов IgM, IgA и IgG в образце плазмы или сыворотки крови человека свидетельствует о развитии гуморального иммунитета у исследуемых людей, инфицированных возбудителем холеры или вакцинированных против холеры.

2.5. Тип анализируемого образца

В качестве анализируемого образца используется плазма (ЭДТА) и сыворотка крови человека

2.6 Принцип качественного аналитического метода исследования

В основе метода иммуноферментного анализа лежит взаимодействие антител, содержащихся в исследуемом образце плазмы или сыворотки крови, с антигенами–субъединицей В холерного токсина или О-антигеном холерного вибриона, сорбированными в лунках стрипов полистироловых планшетов, и последующим образованием иммунных комплексов с пероксидазными конъюгатами на основе моноклональных антител к иммуноглобулинам классов IgM, IgA и IgG человека. Визуализацию иммунных комплексов производят после добавления субстрата для пероксидазы хрена - 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМБ), который под действием атомарного кислорода, образующегося из перекиси водорода, окисляется до продукта, окрашенного в синий цвет. Добавление серной кислоты изменяет цвет раствора на желтый, с максимумом оптического поглощения при 450 нм. Оптическая плотность измеряется с помощью планшетного спектрофотометра для иммуноферментного анализа.

Наличие антител в образце плазмы или сыворотки крови определяют при сравнении с Контролями К(0), содержащими неспецифические антитела различных классов к антигенам бактерий и вирусов, вызывающих острые кишечные инфекции, отличные от холеры.

Планшеты с сорбированными в лунках стрипов холерными антигенами (субъединица В холерного токсина или О-антиген холерного вибриона) обеспечивают аналитическую специфичность МИ.

3. Риски применения медицинского изделия, противопоказания, связанные с применением медицинского изделия по назначению

Риски возникновения опасных последствий применения МИ при его использовании определены согласно ГОСТ ISO 14971-2021.

3.1 Потенциальный риск применения

По степени потенциального риска применения МИ относится к классу 2б.

3.2 Прямой риск применения

При использовании МИ требуется соблюдение мер биологической безопасности и асептической техники взятия биологических образцов. Следует исходить из предположения, что все собранные для исследования с применением МИ образцы представляют собой потенциально инфицированный материал, обращаться с которым следует, соблюдая требования СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

В состав Контролей К(+), К(-) и К(0) входят образцы плазмы крови человека, которые в ходе производства Набора реагентов протестированы на отсутствие антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С и HBsAg.

Стоп-реагент содержит 1 N раствор серной кислоты, обращаться с которой следует, соблюдая технику безопасности согласно ГОСТ 4204-77 и ГОСТ Р52905-2007.

3.3 Косвенный риск применения

Косвенный риск применения МИ связан с вероятностью получения ложноотрицательных результатов, причинами которых могут быть:

- 1) порча отдельных компонентов МИ в результате несоблюдения условий его транспортировки и хранения до использования;
- 2) превышение гарантийных сроков хранения, указанных на этикетках;
- 3) несоблюдение требований инструкции по применению в ходе проведения анализа;
- 4) получение пациентом перед взятием крови иммуносупрессивных препаратов, препаратов моноклональных антител, а также препаратов крови.

3.4. Особые указания

3.4.1. При работе с компонентами Набора реагентов необходимо обращать внимание на тщательность перемешивания реагентов, постоянно контролировать точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток.

3.4.2. Образцы плазмы или сыворотки крови, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлять центрифугированием в течение 10 мин при 6000 об/мин. Не допускается использование исследуемого материала, прошедшего термообработку, консервированного азидом натрия, с выраженным гемолизом, иктеричностью, хилезом и бактериальным проростом.

3.4.3. При работе нельзя допускать подсыхания лунок во время их промывки, избегать попадания прямых солнечных лучей на используемые компоненты.

3.4.4. Набор реагентов предназначен для выявления антител к холерным антигенам только в образцах плазмы или сыворотки крови человека. Не использовать Набор реагентов для определения антител в слюне, мокроте и других образцах биологического материала.

3.4.5. Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры анализа могут повлиять на результаты.

3.4.6. Набор реагентов не предназначен для тестирования образцов плазмы или сыворотки крови новорожденных.

3.4.7. Набор реагентов не нуждается в калибровке с помощью каких-либо дополнительных контрольных материалов.

4. Технические характеристики медицинского изделия

4.1 Состав медицинского изделия

Набор реагентов выпускается в двух моделях, различающихся по антигену, сорбированному на стрипах Сорбент-Антиген. Каждая модель рассчитана на 96 определений, включая контроли К(+), К(-) и К(0).

Модель Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (СВХТ), в составе:

Контроль К(+)
IgM (СВ ХТ), 1 шт.;

Контроль К(+)
IgA (СВ ХТ), 1 шт.;

Контроль К(+)
IgG (СВ ХТ), 1 шт.;

Контроль К(-), 1 шт.;

Контроль К1(0), 1 шт.;

Контроль К2(0), 1 шт.;

Конъюгат анти-IgM, 1 шт.;

Конъюгат анти-IgA, 1 шт.;

Конъюгат анти-IgG, 1 шт.;
ФСР-Т – 20,0 мл, 1 шт.;
ФСР-ТС – 6,0 мл, 1 шт.;
ХСР – 13,0 мл, 1 шт.;
Стоп-реагент – 6,0 мл, 1 шт.;
Рамка со полосами Сорбент-Антиген (СВ ХТ), 1 шт.;
Планшет для разбавления образцов, 2 шт.;
Защитная пленка, 2 шт.;
Инструкция по применению, 1 шт.;
Паспорт качества, 1 шт.

Модель Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (О-АГ), в составе:

Контроль К(+) IgM (О-АГ), 1 шт.;
Контроль К(+) IgA (О-АГ), 1 шт.;
Контроль К(+) IgG (О-АГ), 1 шт.;
Контроль К(-), 1 шт.;
Контроль К1(0), 1 шт.;
Контроль К2(0), 1 шт.;
Конъюгат анти-IgM, 1 шт.;
Конъюгат анти-IgA, 1 шт.;
Конъюгат анти-IgG, 1 шт.;
ФСР-Т – 20,0 мл, 1 шт.;
ФСР-ТС – 6,0 мл, 1 шт.;
ХСР – 13,0 мл, 1 шт.;
Стоп-реагент – 6,0 мл, 1 шт.;
Рамка со полосами Сорбент-Антиген (О-АГ), 1 шт.;
Планшет для разбавления образцов, 2 шт.;
Защитная пленка, 2 шт.;
Инструкция по применению, 1 шт.;
Паспорт качества, 1 шт.

Инструкция по применению может быть дополнительно представлена на официальном веб-сайте производителя (<http://pasteurorg.ru>).

Набор реагентов предназначен для однократного применения.

4.2 Внешний вид компонентов медицинского изделия

Контроль K(+) IgM (СВ ХТ) – сухая пористая масса белого цвета, возможен светло-желтый оттенок, представляющая собой лиофильно высушенный препарат пулированных образцов плазмы крови, полученных от людей, переболевших холерой или вакцинированных против холеры, содержащий антитела класса IgM к холерному антигену СВ ХТ (титр антител класса IgM к СВ ХТ превышает значение 1:10). Перед использованием необходима регидратация.

Контроль K(+) IgA (СВ ХТ) – сухая пористая масса белого цвета, возможен светло-желтый оттенок, представляющая собой лиофильно высушенный препарат пулированных образцов плазмы крови, полученных от людей, переболевших холерой или вакцинированных против холеры, содержащий антитела класса IgA к СВ ХТ (титр антител класса IgA к СВ ХТ превышает значение 1:10). Перед использованием необходима регидратация.

Контроль K(+) IgG (СВ ХТ) – сухая пористая масса белого цвета, представляющая собой лиофильно высушенный препарат пулированных образцов плазмы крови, полученных от людей, переболевших холерой или вакцинированных против холеры, содержащий антитела класса IgG к СВ ХТ (титр антител класса IgG к СВ ХТ превышает значение 1:50). Перед использованием необходима регидратация.

Контроль K(+) IgM (О-АГ) – сухая пористая масса белого цвета, представляющая собой лиофильно высушенный препарат пулированных образцов плазмы крови, полученных от людей, переболевших холерой или вакцинированных против холеры, содержащий антитела класса IgM к О-АГ (титр антител класса IgM к О-АГ превышает значение 1:50). Перед использованием необходима регидратация.

Контроль K(+) IgA (О-АГ) – сухая пористая масса белого цвета, возможен светло-желтый оттенок, представляющая собой лиофильно высушенный препарат пулированных образцов плазмы крови, полученных от людей, переболевших холерой или вакцинированных против холеры, содержащий антитела класса IgA к О-АГ (титр антител класса IgA к О-АГ превышает значение 1:10). Перед использованием необходима регидратация.

Контроль K(+) IgG (О-АГ) – сухая пористая масса белого цвета, представляющая собой лиофильно высушенный препарат пулированных образцов плазмы крови, полученных от людей, переболевших холерой или вакцинированных против холеры, содержащий антитела класса IgG к О-АГ (титр антител класса IgG к холерному антигену О-АГ превышает значение 1:50). Перед использованием необходима регидратация.

Контроль K(-) – сухая пористая масса белого цвета, представляющая собой лиофильно высушенный стабилизирующий материал для лиофильной сушки, не

содержащий антител к холерным антигенам. Перед использованием необходима регидратация.

Контроль K1(0) – сухая пористая масса белого цвета, представляющая собой лиофильно высушенный препарат пулированных образцов плазмы, полученных от не болевших холерой и не вакцинированных от холеры здоровых доноров, содержащий неспецифические антитела классов IgM, IgG и IgA к антигенам бактерий, вызывающих кишечные инфекции, отличные от холеры. Перед использованием необходима регидратация.

Контроли K2(0) – сухая пористая масса светло-желтого цвета, представляющая собой лиофильно высушенный препарат пулированных образцов плазмы, полученных от не болевших холерой и не вакцинированных от холеры здоровых доноров, содержащий неспецифические антитела классов IgM, IgG и IgA к антигенам бактерий, вызывающих кишечные инфекции, отличные от холеры. Перед использованием необходима регидратация.

Конъюгат анти-IgM– сухая пористая масса синего цвета, представляющая собой лиофильно высушенный препарат моноклонального антитела к иммуноглобулинам человека класса IgM, конъюгированного с пероксидазой хрена. Перед использованием необходима регидратация.

Конъюгат анти-IgA – сухая пористая масса синего цвета, представляющая собой лиофильно высушенный препарат моноклонального антитела к иммуноглобулинам человека класса IgA, конъюгированного с пероксидазой хрена. Перед использованием необходима регидратация.

Конъюгат анти-IgG – сухая пористая масса синего цвета, представляющая собой лиофильно высушенный препарат моноклонального антитела к иммуноглобулинам человека класса IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена. Перед использованием необходима регидратация.

ФСР-Т–прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой 25-кратный концентрат промывочного фосфатно-солевого буферного раствора с твином-20.

ФСР-ТС –прозрачная жидкость желтого цвета, представляющая собой 25-кратный концентрат промывочного фосфатно-солевого буферного раствора с твином-20, содержащая сыворотку крови крупного рогатого скота и 0,02 % мертиолята.

ХСР–прозрачная бесцветная или слегка голубоватого цвета жидкость, представляющая собой хромоген-субстратный раствор, содержащий ТМБ и перекись водорода. Готов к использованию.

Стоп-реагент прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой 1N раствор серной кислоты. Готов к использованию.

Рамка со полосами Сорбент-Антиген (СВ ХТ)– герметично запаянная под вакуумом в фольгированную вакуумную пленку полимерная рамка, содержащая 12 8-луночных полистироловых стрипов с сорбированной субъединицей В холерного токсина.

Рамка со полосами Сорбент-Антиген (О-АГ)– герметично запаянная под вакуумом в фольгированную вакуумную пленку полимерная рамка, содержащая 12 8-луночных полистироловых стрипов с сорбированным О-антигеном холерного вибриона.

Планшет для разбавления образцов–96-луночный планшет с плоским или круглым дном для предварительного разбавления образцов.

Защитная пленка – ПВХ пленка с клейкой поверхностью для заклеивания стрипов.

В составе медицинского изделия отсутствуют вещества, которые, в случае их отдельного применения, могли бы рассматриваться в качестве лекарственного средства. В состав набора входят следующие:

- биоматериалы человеческого происхождения: образцы плазмы крови человека, в которой антитела к ВИЧ 1, 2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют

- биоматериалы животного происхождения: сыворотка крови крупного рогатого скота, БСА, моноклональные антитела.

Таблица 1 – Габаритные размеры

Наименование компонента	Размеры, мм
Планшет для разбавления образцов	(127,0 мм × 85,0 мм × 14,0 мм) ±1,0%
Защитная пленка	(135,0 × 82,0 мм × 0,08 мм) ±1,0%

5 Характеристики аналитической эффективности медицинского изделия

5.1 Значения Контролей

Контроли К(+) характеризуются индексом позитивности (ИП), рассчитанным по формуле:

$$ИП_{К(+)} = (ОП_{К(+)} - ОП_{К(-)}) / (ОП_{К(0)} - ОП_{К(-)}),$$

где ОП_{К(+)}– оптическая плотность Контроля К(+), ОП_{К(-)} и ОП_{К(0)} – оптические плотности К(-) и К(0).

Нормативные значения индекса позитивности Контролей К(+)) для каждой модели МИ, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Нормативные значения индекса позитивности Контролей К(+).

Наименование контроля	Значение индекса
-----------------------	------------------

	позитивности
Контроль К(+) IgM(СВ ХТ)	>1,3
Контроль К(+) IgA(СВ ХТ)	>1,3
Контроль К(+) IgG (СВ ХТ)	>5,0
Контроль К(+) IgM(О-АГ)	>1,3
Контроль К(+) IgA(О-АГ)	>10,0
Контроль К(+) IgG (О-АГ)	>5,0

Контроль К(0) характеризуется значением оптической плотности (ОП) в оптических единицах (о.е.). Нормативные значения ОП Контроля К(0) для каждой модели МИ представлены в таблице 3.

Таблица 3– Нормативные значения оптической плотности Контролей К(0).

Класс иммуноглобулина/антиген	Значение оптической плотности, о.е.
IgM/СВ ХТ	0,09-0,60
IgA/СВ ХТ	0,05-0,30
IgG/СВ ХТ	0,09-0,40
IgM/О-АГ	0,09-0,60
IgA/О-АГ	0,05-0,30
IgG/О-АГ	0,09-0,40

5.2 Повторяемость (внутрисерийная)

Повторяемость значений индекса позитивности при многократных определениях антител в анализируемых образцах внутри одной серии МИ по коэффициенту вариации (CV) не превышает 15%.

5.3 Воспроизводимость (межсерийная)

Воспроизводимость значений индекса позитивности при определениях антител в анализируемых образцах в двух различных сериях МИ по коэффициенту вариации (CV) не превышает 15%.

5.4 Специфичность

Аналитическая специфичность Набора реагентов при анализе образцов плазмы или сыворотки крови, полученных от людей, перенесших острые кишечные инфекции (дизентерия, эшерихиоз, сальмонеллез, ротавирусная инфекция, норовирусная инфекция), отличные от холеры, подтверждена ввиду полного отсутствия ложноположительных реакций.

Возможность появления неспецифических реакций антител различных классов, способных интерферировать с антителами к холерным антигенам и давать ложноположительные результаты, устранена в результате разбавления исследуемых образцов плазмы или сыворотки крови в 50 раз для определения антител класса IgG к субъединице В холерного токсина (модель Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (СВ ХТ)) и классов

IgG и IgM к О-антигену холерного вибриона (модель Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (О-АГ)) и в 10 раз для определения антител класса IgM и IgA к субъединице В холерного токсина (модель Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (СВ ХТ)) и классов IgA к О-антигену холерного вибриона (модель Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (О-АГ)). Кроме того, неспецифическое связывание иммуноглобулинов с поверхностью ячеек стрипов иммуносорбента исключено с помощью специальных блокирующих агентов.

5.5 Возможное интерферирующее влияние эндогенных факторов

Возможное интерферирующее влияние эндогенных факторов в виде следовых количеств гемоглобина, липопротеидов и триглицеридов отсутствует при разбавлении образца анализируемой плазмы или сыворотки крови в 50 раз для определения антител класса IgG к субъединице В холерного токсина и классов IgG и IgM к О-антигену холерного вибриона и в 10 раз для определения антител класса IgM и IgA к субъединице В холерного токсина и классов IgA к О-антигену холерного вибриона. Возможные эндогенные интерферирующие вещества в анализируемых образцах плазмы или сыворотки крови (гемоглобин – до 1000 мг/дл, билирубин – до 60 мг/дл и триглицериды – до 50 мг/дл) не влияют на эффективность измерений.

5.6 Характеристики клинической эффективности

Диагностическая чувствительность при исследовании клинических образцов плазмы, содержащих антитела человека разных классов к субъединице В холерного токсина (СВ ХТ) и О-антигену (О-АГ) – 100% (95% ДИ: 86,28 – 100,00).

Диагностическая чувствительность при исследовании образцов от здоровых вакцинированных вакциной против холеры доноров, содержащих антитела человека разных классов к субъединице В холерного токсина (СВ ХТ) и О-антигену (О-АГ) – 82,6% (95% ДИ: 61,22 – 95,05).

Диагностическая специфичность для испытуемого медицинского изделия при исследовании образцов плазмы, полученные от людей, перенесших острые кишечные инфекции – 100% (95% ДИ: 86,28 – 100,00).

6. Меры предосторожности

6.1. Для диагностики *in vitro*.

6.2. Только для профессионального использования

6.3. Работа с Набором реагентов должна проводиться в лаборатории, выполняющей серологические и диагностические исследования с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и методических указаний МУ287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского

назначения».

6.4. При работе необходимо выполнять следующие требования:

- постановку ИФА следует проводить в помещении с температурой от 20°C до 25°C и относительной влажностью от 15 % до 75 %;
- перед началом работы следует ознакомиться с инструкцией по применению;
- все компоненты Набора реагентов перед началом работы необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 30мин;
- не допускается использование Набора реагентов после истечения его срока годности, указанного на упаковке;
- работы по пипетированию должны выполняться с использованием одноразовых наконечников для дозаторов;
- все использованные одноразовые материалы и остатки образцов должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»;
- не допускать контакта реагентов МИ с глазами и слизистой оболочкой. При контакте обильно промыть участок контакта водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью;
- во избежание деградации нанесенного биоматериала при работе с компонентами Набора реагентов следует избегать воздействия высоких температур, влаги и прямого солнечного света.

6.5. Серная кислота, входящая в состав Стоп-реагента, обладает раздражающим действием, в связи с чем следует обращаться с ней с осторожностью. При попадании раствора Стоп-реагента на кожу и слизистые промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

6.6. ФСР-ТС содержит 0,02 % мертиолята, в связи с чем следует обращаться с ним с осторожностью.

7. Анализируемые образцы

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными. Медицинские работники, которые собирают или транспортируют клинические образцы в лабораторию, должны быть обучены практике

безопасного обращения с биоматериалом, строго соблюдать меры предосторожности и использовать средства индивидуальной защиты.

Исследуемые образцы плазмы или сыворотки крови хранят при температуре от 2 до 8°C не более 3 суток от момента взятия крови. Допускается хранение образцов в замороженном состоянии при температуре не выше минус 18°C не более 1 года. Перед использованием образцы размораживают при температуре от 16 до 25°C и перемешивают встряхиванием. Образцы, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлять центрифугированием 10 мин при 6000об./мин. Не допускается использование исследуемого материала, прошедшего термообработку (в том числе многократная заморозка, консервированного азидом натрия, с выраженным гемолизом, иктеричностью, хилезоми бактериальным проростом ввиду возможной интерференции гемоглобина, билирубина, липидов и продуктов жизнедеятельности микроорганизмов в высокой концентрации. Образцы цельной плазмы или сыворотки могут подвергаться замораживанию/оттаиванию не более одного раза. Повторное замораживание разбавленных образцов не допускается.

Обязательным условием является разбавление перед использованием исследуемых образцов плазмы или сыворотки крови в 50 раз для определения антител класса IgG к субъединице В холерного токсина (модель Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (CB XT)) и классов IgG и IgM к О-антигену холерного вибриона (модель Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (O-АГ)) и в 10 раз для определения антител класса IgM и IgA к субъединице В холерного токсина (модель Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (CB XT)) и классов IgA к О-антигену холерного вибриона (модель Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (O-АГ)).

8. Требуемое дополнительное оборудование и материалы

- Анализатор иммунологический, например, анализатор иммунологический «MultiskanFC» с принадлежностями, РУ № ФСЗ 2011/11001 от 13.07.2021;
- Промыватель планшетов, например, промыватель планшетов автоматический «Аквамарин» с принадлежностями: терминал контроля объема жидкости, РУ № ФСЗ 2008/01794 от 10.06.2021;
- Термошейкер, например, термошейкер PST-60HL-4, РУ № ФСЗ 2008/01398 от 10.06.2021;
- Микроцентрифуга встряхиватель, например, микроцентрифуга встряхиватель низкоскоростная «Циклотемп-901» по ТУ 9452-003-96136299-2012, РУ № РЗН 2014/1454 от 03.03.2012;
- Дозаторы пипеточные механические, например, дозаторы пипеточные механические одноканальные Sartorius с принадлежностями в моделях: Дозатор

пипеточный механический одноканальный и многоканальный Sartorius с принадлежностями, в вариантах исполнения: LIII. Дозатор пипеточный механический 1-канальный Tasta с варьируемым объемом дозирования 2-20 мкл; Дозатор пипеточный механический одноканальный и многоканальный Sartorius с принадлежностями, в вариантах исполнения: LV. Дозатор пипеточный механический 1-канальный Tasta с варьируемым объемом дозирования 20-200 мкл; Дозатор пипеточный механический одноканальный и многоканальный Sartorius с принадлежностями, в вариантах исполнения: LVI. Дозатор пипеточный механический 1-канальный Tasta с варьируемым объемом дозирования 100-1000 мкл, РУ № РЗН 2019/9356 от 12.12.2019;

- Наконечники для дозаторов медицинские полимерные, например, наконечники для дозаторов медицинские полимерные МиниМед, тип Biohit на 2–200 мкл и 50–1000 мкл (МиниМед), по ТУ 32.50.50-030-29508133-2019, РУ № РЗН 2020/12142 от 04.12.2020;

- Микропробирки, например, изделия медицинские вспомогательные для лабораторных исследований и взятия биоматериалов. 26. Микропробирки полипропиленовые конические с колпачком типа Эппендорф, РУ № ФСЗ 2010/06000 от 21.04.2020;

- Вода дистиллированная (ГОСТ 6709 - 72);

- Фильтровальная бумага;

- Ванночки для реагентов;

- Мерные стеклянные цилиндры;

- Флаконы для разведения конъюгата.

Допускается применение других материалов и оборудования, эквивалентных по характеристикам и квалификации.

9. Проведение исследования

9.1 Подготовка реагентов

9.1.1. Реагенты, готовые к применению

ХСР, Стоп-реагент готовы к использованию.

ХСР, Стоп-реагент хранить в закрытых пробирках и флаконах в течение 1 месяца после вскрытия при температуре от 2 до 8 °С.

9.1.2 Реагенты, требующие предварительного приготовления

9.1.2.1 Подготовка рабочего раствора ФСР-Т

ФСР-Т используется для промывки ячеек стрипов. Для получения рабочего раствора исходный 25-кратный концентрат ФСР-Т разбавляют в 25 раз. В мерный цилиндр, в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблица 4), вносят нужное количество концентрата ФСР-Т и доводят до соответствующего объема

дистиллированной водой. Полученный рабочий раствор следует хранить не более 1 месяца при температуре от 2 до 8°C.

Таблица 4 – Расход реагентов для приготовления рабочего раствора ФСР-Т

Кол-во стрипов	Рабочий раствор ФСР-Т	
	х25 ФСР-Т, мл	Дист. вода, мл
1	1,2	до 30
2	2,4	до 60
3	3,6	до 90
4	4,4	до 120

9.1.2.2 Подготовка рабочего раствора ФСР-ТС

Раствор ФСР-ТС используется для блокирования неспецифического связывания антител, содержащихся в образцах, с поверхностью ячеек стрипов, а также для приготовления рабочих растворов Контролей и Конъюгатов.

Для получения рабочего раствора исходный 25-кратный концентрат ФСР-ТС разбавляют в 25 раз. В мерный цилиндр, в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблица 5), вносят требуемое количество концентрата ФСР-ТС и доводят до соответствующего объема дистиллированной водой. Полученный рабочий раствор следует хранить не более 1 месяца при температуре от 2 до 8°C.

Таблица 5– Расход реагентов для приготовления рабочего раствора ФСР-ТС

Кол-во стрипов	Рабочий раствор ФСР-ТС	
	25-кратный ФСР-ТС, мл	Дист. вода, мл
1	0,16	до 4
2	0,32	до 8
3	0,48	до 12
4	0,64	до 16

9.1.2.3. Приготовление растворов 25-кратных концентратов Конъюгатов (анти-IgG, анти-IgM, анти-IgA)

Для получения растворов 25-кратных концентратов Конъюгатов (анти-IgM, анти-IgA, анти-IgG) лиофильно высушенные Конъюгаты регидратируют, добавляя 0,6 мл дистиллированной воды. Время регидратирования должно составлять не менее 30 минут. В течение указанного времени необходимо перемешать содержимое пробирок при помощи встряхивателя или пипетированием не менее 2 раз (рекомендуется осуществлять перемешивание спустя 10 и 20 минут от начала процесса регидратации). Полученные растворы концентратов Конъюгатов (анти-IgM, анти-IgA, анти-IgG) следует хранить не более 30 суток при температуре от 2 до 8°C. Для получения рабочих растворов

Конъюгатов (анти-IgM, анти-IgA, анти-IgG) регидратированные 25-кратные концентраты Конъюгатов (анти-IgM, анти-IgA, анти-IgG,) разбавляют в 25 раз, используя в качестве растворителя рабочий раствор ФСР-ТС. Для этого, в соответствии с числом используемых стрипов, к нужному количеству рабочего раствора ФСР-ТС добавляют необходимое количество концентрата Конъюгата (таблица 6). Полученный рабочий раствор Конъюгата можно хранить не более 4 ч при температуре от 2 до 8°C.

Таблица 6 – Расход реагентов для приготовления рабочих растворов Конъюгатов анти-IgM, анти-IgA, анти-IgG

Кол-во стрипов	Рабочий раствор Конъюгата	
	25-кратные концентраты Конъюгатов (анти-IgM, анти-IgA, анти-IgG), мл	Рабочий раствор ФСР-ТС, мл
1	0,04	0,96
2	0,08	1,92
3	0,12	2,88
4	0,16	3,84

9.1.2.4 Приготовление Контролей

Контроль K(+) IgM (СВ ХТ), Контроль K(+) IgA (СВ ХТ), Контроль K(+) IgG (СВ ХТ), Контроль K(+) IgM (О-АГ), Контроль K(+) IgA (О-АГ), Контроль K(+) IgG (О-АГ) в 0,3 мл дистиллированной воды. Контроли K1(0) и K2(0) и Контроль K(-) регидратировать в 0,9 мл дистиллированной воды. Время регидратации должно составлять не менее 30 минут. В течение указанного времени необходимо перемешивать содержимое пробирок при помощи встряхивателя или пипетированием не менее 2 раз (рекомендуется осуществлять перемешивание спустя 10 и 20 минут от начала процесса регидратации).

После регидратации Контроли K(+), K(-), K (0) готовы к использованию.

Регидратированные Контроль K(+) IgM (СВ ХТ), Контроль K(+) IgA (СВ ХТ), Контроль K(+) IgG (СВ ХТ), Контроль K(+) IgM (О-АГ), Контроль K(+) IgA (О-АГ), Контроль K(+) IgG (О-АГ), Контроль K(-), Контроль K1(0), Контроль K2(0) в зависимости от количества исследуемых образцов плазмы или сыворотки крови при необходимости могут быть разделены на несколько равных частей, например, на 4, и храниться до использования при температуре не выше минус 20°C в течение не более 30 суток. Замороженные аликвоты можно использовать только однократно (повторное замораживание не рекомендуется).

9.2. Проведение иммуноферментного анализа

Точность приготовления Контролей и разбавления исследуемых образцов определяет качество результатов анализа.

9.2.1 Предварительное разбавление исследуемых образцов плазмы или сыворотки крови

При использовании модели Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (СВ ХТ) исследуемые образцы плазмы или сыворотки крови следует разбавлять в 50 раз для исследования антител класса IgG и в 10 раз для исследования классов IgM и IgA в лунках Планшетов для разбавления образцов или в индивидуальных микропробирках типа «Эппендорф».

При использовании модели Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (О-АГ) исследуемые образцы плазмы или сыворотки крови следует разбавлять в 50 раз для исследования антител классов IgM и IgG и в 10 раз для исследования класса IgA в лунках Планшетов для разбавления образцов или в индивидуальных микропробирках типа «Эппендорф».

Для разбавления в 50 раз в ячейки Планшета для разбавления образцов вносят по 196 мкл ФСР-ТС и добавляют по 4 мкл образца, тщательно перемешивая пипетированием.

Для разбавления в 10 раз в ячейки Планшета для разбавления образцов вносят по 180 мкл ФСР-ТС и добавляют по 20 мкл образца, тщательно перемешивая пипетированием.

Необходимо обратить особое внимание на процесс перемешивания образцов плазмы или сыворотки крови при разбавлении.

9.2.2 Предварительная подготовка стрипов Сорбент-Антиген (СВ ХТ) и стрипов Сорбент-Антиген (О-АГ)

Вскрыть фольгированный пакет с Рамкой со стрипами Сорбент-Антиген, отрезав ножницами запаянный конец. Раскрыть застежку типа «зип-лок», извлечь Рамку со стрипами. Оставить в ней необходимое для проведения анализа количество стрипов; оставшиеся стрипы поместить в фольгированный пакет и закрыть застежку.

Независимо от моделей МИ и количества используемых стрипов пометить маркером отобранные стрипы буквами М, А, G согласно схеме, представленной на таблице 7.

Таблица 7 – Схема внесения Контролей К(-), К(+), К(0) и предварительно разведенных образцов плазмы или сыворотки крови для модели Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (СВ ХТ) (а) и модели Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (О-АГ) (б)

а

	М	А	G
	1	2	3
A	K(-)	K(-)	K(-)
B	K(+) IgM	K(+) IgA	K(+) IgG
C	K2(0)	K2(0)	K1(0)

б

	М	А	G
	1	2	3
A	K(-)	K(-)	K(-)
B	K(+) IgM	K(+) IgA	K(+) IgG
C	K1(0)	K2(0)	K1(0)

D	Обр. 1	Обр. 1	Обр. 1
E	Обр. 2	Обр. 2	Обр. 2
F	Обр. 3	Обр. 3	Обр. 3
G	Обр. 4	Обр. 4	Обр. 4
H	Обр. 5	Обр. 5	Обр. 5

D	Обр. 1	Обр. 1	Обр. 1
E	Обр. 2	Обр. 2	Обр. 2
F	Обр. 3	Обр. 3	Обр. 3
G	Обр. 4	Обр. 4	Обр. 4
H	Обр. 5	Обр. 5	Обр. 5

Провести трехкратную промывку лунок стрипов рабочим раствором ФСР-Т в объеме 350 мкл на каждую лунку, используя автоматический промыватель планшетов.

9.2.3 Внесение ФСР-ТС

После завершения промывки внести в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора ФСР-ТС. Данная операция должна проводиться сразу после промывки лунок. Поместить рамку со стрипами в термошейкер и инкубировать в течение 1 ч при температуре 37°C и при постоянном перемешивании при от 450 до 550 об./мин. Время внесения всех исследуемых проб не должно превышать 15 минут.

Провести трехкратную промывку лунок рабочим раствором ФСР-Т в объеме 350 мкл на каждую лунку, используя автоматический промыватель планшетов.

9.2.4 Внесение Контролей и исследуемых образцов

После завершения промывки лунок внести реагенты и исследуемые образцы плазмы или сыворотки крови, объем которых зависит от модели МИ и класса определяемых антител, согласно таблицам 7 и 8.

Таблица 8 – Объем вносимых реагентов в зависимости от модели МИ и класса определяемых антител

Вносимые реагенты	Объем, мкл					
	Модель Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (CB XT)			Модель Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (O-АГ)		
	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG
ФСР-ТС	150	150	150	150	150	150
Контроль К(+) IgM	50	-	-	50	-	-
Контроль К(+) IgA	-	50	-	-	50	-
Контроль К(+) IgG	-	-	50	-	-	50
Контроль К(-)	50	50	50	50	50	50
Контроль К1(0)	-	-	50	50	-	50
Контроль К2(0)	50	50	-	-	50	-
Образец плазмы/сыворотки, разбавленный в 50 раз	-	-	50	50	-	50
Образец плазмы/сыворотки, разбавленный в 10 раз	50	50	-	-	50	-

Данная процедура должна проводиться сразу после промывки лунок.

Поместить рамки со стрипами в термошейкер и инкубировать в течение 1 ч при температуре 37 °С и при постоянном перемешивании при от 450 до 550 об./мин. Время внесения всех исследуемых проб не должно превышать 15 минут.

При необходимости определения титра антител определенного класса в выявленных положительных образцах использовать иную схему внесения образцов, включающую Контроли: Контроль К(-), Контроль К1(0), Контроль К2(0), Контроль К(+), IgM, Контроль К(+), IgA, Контроль К(+), IgG (в зависимости от необходимости), а также протитрованные положительные образцы плазмы или сыворотки крови (семь последовательных двукратных разведений), приготовленные предварительно на Планшете для разбавления образцов следующим образом.

В лунки А–Г Планшета для разбавления вносят по 100 мкл ФСР-ТС. Затем в лунку А вносят 100 мкл образца, предварительно разбавленного в 50 или 10 раз. После осторожного пипетирования из этой лунки переносят 100 мкл жидкости в лунку В. Повторяют данную процедуру, последовательно перенося перемешанную жидкость от лунки к лунке до лунки Н. В результате такого двукратного титрования в лунках В–Г происходит разбавление антител от 1:200 до 1:12800 для образцов, предварительно разбавленных в 50 раз, и от 1:40 до 1:2560 для образцов, предварительно разбавленных в 10 раз.

Затем в Рамку для стрипов помещают необходимое количество стрипов и вносят в каждую лунку по 150 мкл ФСР-ТС. Переносят из лунок В–Г Планшета для разбавления по 50 мкл раститрованного образца в соответствующие лунки В–Г стрипов, помещают рамки со стрипами в термошейкер и инкубируют в течение 1 ч при температуре 37 °С при постоянном перемешивании при от 450 до 550 об./мин. Время внесения всех исследуемых проб не должно превышать 15 минут.

9.2.5 Промывка после инкубации с исследуемыми образцами

По завершении инкубации лунки стрипов необходимо троекратно промыть рабочим раствором ФСР-Т в объеме 350 мкл на каждую лунку, используя автоматический промыватель.

9.2.6 Инкубация с Конъюгатами анти-IgM, анти-IgA, анти-IgG

После промывки внести в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора соответствующего Конъюгата. Поместить Рамку со стрипами в термошейкер и инкубировать, как описано в п. 9.2.3.

9.2.7 Промывка после инкубации с Конъюгатами анти-IgM, анти-IgA, анти-IgG

По завершении инкубации лунки стрипов необходимо троекратно промыть рабочим раствором ФСР-Т, как в п. 9.2.3.

9.2.8 Дополнительная промывка дистиллированной водой

По завершении промывки рабочим раствором ФСР-Т, лунки необходимо дополнительно промыть двукратно дистиллированной водой при тех же режимах, что и в п. 9.2.3.

9.2.9 Проведение ферментативной реакции

По завершении дополнительной промывки в каждую лунку стрипов внести по 100 мкл ХСР. Инкубировать в защищенном от света месте при температуре от 18 до 22°C в течение 15 минут.

9.2.10 Остановка ферментативной реакции

Во все лунки внести по 50 мкл Стоп-реагента.

9.2.11. Оценка индекса позитивности для Контролей К(+) и образцов плазмы или сыворотки крови и оптической плотности для Контроля К(0)

Оптическая плотность (ОП) измеряется с помощью анализатора иммунологического с программным обеспечением для иммуноферментного анализа. Согласно инструкции к прибору перед проведением анализа на приборе создают шаблон планшета, в котором задают значения длины волны 450 нм, расположение Контролей К(-), К(+) и К(0) и образцов плазмы или сыворотки крови.

Результат учитывается, если значения индекса позитивности в лунках с Контролями К(+) соответствуют нормативным значениям таблицы 2, а ОП в лунках с Контролем К(0) соответствуют нормативным значениям таблицы 3.

В случае невыполнения данных условий, полученные результаты не подлежат обсчету и интерпретации; исполнителю необходимо повторить анализ, используя другой Набор реагентов.

9.3 Учет и интерпретация результатов

Вычислить индекс позитивности (ИП) образцов по следующей формуле:

$$\text{ИП}_{\text{обр.}} = (\text{ОП}_{\text{обр.}} - \text{ОП}_{\text{К(-)}}) / (\text{ОП}_{\text{К(0)}} - \text{ОП}_{\text{К(-)}}),$$

где $\text{ОП}_{\text{обр.}}$ – оптическая плотность исследуемого образца,

$\text{ОП}_{\text{К(-)}}$ и $\text{ОП}_{\text{К(0)}}$ – оптические плотности К(-) и К(0), соответственно.

Результат анализа считается положительным, если $\text{ИП}_{\text{обр.}} \geq 1,1$, что соответствует титру антител $\geq 1:50$ для IgG к СВ ХТ и IgG и IgM к О-АГ; титру антител $\geq 1:10$ для IgM и IgA к СВ ХТ и IgA к О-АГ.

Результат анализа считается отрицательным, если $\text{ИП}_{\text{обр.}} < 1,1$.

При исследовании образцов с использованием обеих моделей МИ (Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (CBXT) и Анти-АГ-Vibrio cholerae PS (О-АГ)) результат анализа считается положительным, если $ИП_{обр} \geq 1,1$ хотя бы по одному из классов определяемых антител (IgM, IgA, IgG) соответствующей специфичности.

При необходимости уточнения титра в выявленных положительных образцах проводят дополнительное титрование. За окончательное значение титра антител классов IgM, IgA и IgG к холерным антигенам (субъединица В холерного токсина или О-антиген холерного вибриона) принимается последнее разведение исследуемого образца, при котором в соответствующей лунке значение $ИП_{обр} \geq 1,1$.

10. Утилизация

Медицинские изделия, пришедшие в непригодность в связи с истечением срока годности на складе производителя, не выдержавшие контроль качества, забракованные, относятся к отходам производства и подлежат утилизации в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами, также нормативными документами в сфере обращения с отходами.

Отходы, образующиеся в результате применения набора реагентов пользователями по назначению, установленному производителем относятся к медицинским отходам класса В, утилизируемым согласно СанПиН 2.1.3684-21.

11. Условия транспортирования и хранения

11.1 Требование к транспортированию

Транспортировать МИ следует всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта.

Транспортирование МИ должно осуществляться в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов при температуре от 2 до 8°C. Допускается транспортирование в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, при окружающей температуре от 20 до 25°C в течение не более 3 суток.

МИ, транспортировавшиеся с нарушением температурного и временного режимов, а также с нарушением целостности упаковки предприятия-производителя, использованию не подлежат.

11.2. Хранение

Компоненты набора реагентов до вскрытия должны храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности – 12 месяцев, после вскрытия – в течение 1 месяца. Рабочий раствор ФСР-Т после подготовки должен храниться при температуре от 2 до 8°C не более 1 месяца. Рабочий раствор ФСР-ТС после подготовки должен храниться при температуре от 2 до 8°C не

более 1 суток. Рабочие растворы Конъюгатов после подготовки должен храниться при температуре от 2 до 8°C не более 4 ч.

МИ, хранившиеся с нарушением температурного режима, использовать запрещается, их необходимо утилизировать как пришедшие в негодность.

12. Срок годности медицинского изделия

Гарантийный срок годности составляет 12 месяцев с даты выпуска и указан на упаковке Набора реагентов. По истечении срока годности Набор реагентов использованию не подлежит.

13. Объяснение используемых символов

Таблица 9- Символы, которые используются для маркировки МИ

Символ	Название символа
	Изготовитель
	Дата изготовления
	Использовать до
	Код партии
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Содержит кровь или производные плазмы крови

	<p>Не стерильно</p>
	<p>Медицинское изделие для диагностики in vitro</p>
	<p>Содержимого достаточно для проведения <n> тестов</p>
	<p>Не допускать воздействия солнечного света</p>
	<p>Не допускать воздействия влаги</p>
	<p>Осторожно</p>
	<p>Верх</p>
	<p>Хрупкое, обращаться осторожно</p>

14. Рекламации

По вопросам, касающимся качества медицинского изделия «Набор реагентов для иммуноферментного качественного определения антител человека классов IgM, IgA и IgG к холерным антигенам (Анти-АГ–*Vibrio cholerae* PS)», следует обращаться к предприятию - изготовителю: Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера)» по адресу: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, телефон: (812)233-20-92, факс: (812) 644-63-10, электронный адрес: pasteur@pasteurorg.ru, официальный веб-сайт: <http://pasteurorg.ru>.