

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
антигена вируса клещевого энцефалита
(ВектоВКЭ-антиген)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса клещевого энцефалита «ВектоВКЭ-антиген» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления антигена вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в клещах и ликворе человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Для исследования небольшой партии проб возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на двухстадийном твердофазном иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител к ВКЭ.

Во время первой инкубации происходит связывание содержащегося в анализируемом образце антигена ВКЭ с моноклональными антителами к ВКЭ, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета,

Во время второй инкубации связавшийся антиген ВКЭ взаимодействует с конъюгатом моноклональных антител к ВКЭ с пероксидазой хрена.

Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена ВКЭ в анализируемом образце.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, нач. лаборатории И.Н. Кушиновой.

2.2. Состав набора

В состав набора входят следующие реагенты:

- планшет разборный (12 восьмиугольных стрипов, «ломающихся» по 1 лунке) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ВКЭ, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) – буферный раствор, содержащий антиген ВКЭ, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) – буферный раствор, не содержащий антигена ВКЭ, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат – моноклональные антитела к ВКЭ, конъюгированные с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- раствор для разведения образцов – 3 флакона (по 12 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28 мл);
- раствор тетраметилбензидина, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент – 1 флакон (12 мл).

Принадлежности:

- пленки для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночки для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для дозаторов на 2–200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления антигена ВКЭ – соответствие результатов определения набором антигена ВКЭ требованиям стандартного образца предприятия (СОП+) (рег. № 05-2-84), аттестованного ОБТК ЗАО «Вектор-Бест». СОП⁺ имеет титр не менее 1:32. Титр СОП⁺ – наибольшее разведение, при котором среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с СОП⁺ больше либо равно величине критического значения оптической плотности ОП_{крит.}

3.2. Специфичность выявления антигена ВКЭ – соответствие результатов определения набором антигена ВКЭ требованиям стандартного образца предприятия (рег. № 05-2-83), аттестованного ОБТК ЗАО «Вектор-Бест»: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с СОП⁺ меньше ОП_{крит.}

3.3. Диагностическая чувствительность выявления антигена вируса клещевого энцефалита: клинические испытания, проведенные на 136 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97,8 %-100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления антигена вируса клещевого энцефалита: клинические испытания, проведенные на 1238 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 99,8 %-100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г и в методических указаниях МУ 287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998 г).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы клещей и ликвор человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать вирус клещевого энцефалита, возбудителей других инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;

– термостатируемый шейкер орбитального типа на 400 об/мин, поддерживающий температуру (24–26)°С;

– холодильник бытовой;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– дозаторы полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5-5000 мкл (погрешность не более 5%);

– промывочное устройство для планшетов;

– перчатки медицинские диагностические одноразовые;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– дезинфицирующий раствор.

Для подготовки суспензий клещей:

– микропробирки вместимостью 1,5-2,0 мл;

– штативы для микропробирок;

– металлические пестики для измельчения клещей и жидкий азот либо гомогенизатор для измельчения биологических материалов;

– центрифуга для микропробирок.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Требования к образцам

Для проведения анализа следует использовать целые экземпляры клещей, так как результаты анализа фрагментов могут быть недостоверны.

Допускается использование для анализа ликвора и клещей, хранившихся при температуре (2-8) °С не более 5 суток либо при температуре минус (18-60) °С не более 3 месяцев.

6.2 Подготовка образцов

Ликвор использовать для анализа без дополнительной подготовки.

Для очищения клещей от загрязнений веществами, использованными для удаления присосавшихся особей (масло, бензин и т.п.), перед приготовлением суспензии следует провести их промывку. В случае если клещ не загрязнён, можно сразу приступить к приготовлению суспензии.

Клеща обмыть 70%-ным раствором этилового спирта, высушить при помощи фильтровальной бумаги. Поместить в пронумерованную пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и плотно закрыть. Пробирку с клещом поместить в емкость с жидким азотом и заморо-

зять в течение 20 мин.

Достать замороженную пробирку с клещом и сразу тщательно измельчить клеща с помощью пестика для гомогенизации клещей, совмещая вращательные движения с надавливанием. Не вынимая пестика, поставить пробирку с измельченным клещом в штатив. Добавить в пробирку 220 мкл РРО. Аккуратно ополоснув пестик в содержимом пробирки, вынуть его и поместить в дезинфицирующий раствор. Для напитавшихся клещей, а также клещей больших размеров РРО вносить в количестве, пропорциональном их объему, но не менее 400 мкл. Перемешать содержимое пробирки на шейкере (5–10 секунд).

Центрифугировать в течение 5 мин при 3000 об/мин. Для анализа использовать супернатант.

Для каждого образца клеща следует использовать отдельный пестик во избежание контаминации. Для повторного использования пестик необходимо инактивировать: выдержать в 70%-ном растворе этилового спирта в течение 30 мин, затем промыть дистиллированной водой и высушить.

Допускается хранение подготовленных для анализа образцов клещей в течение суток при температуре от 2 до 8 °С или в течение 3-х месяцев при температуре минус (18-60) °С. Транспортировка клещей и образцов суспензий клещей должна осуществляться в специальных термоконтейнерах с хладоэлементом, термосах с термопакетами, льдом.

При использовании для подготовки образцов гомогенизатора, работу по подготовке проводить согласно инструкции к прибору.

Не допускается использовать для гомогенизации клеща пористые материалы (такие, как керамическая ступка с пестиком).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °С не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета.

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

Хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного и отрицательного контрольных образцов.

Положительный и отрицательный контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Конъюгат после первого вскрытия флакона можно хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ.

Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным ТМБ).

Раствор ТМБ после первого вскрытия флакона можно хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
1	2,0	До 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.7. Стоп-реагент готов к использованию.

Стоп-реагент после первого вскрытия флакона можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.8. В лунки А-1, В-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K⁻).

В лунку С-1 внести 100 мкл положительного контрольного образца (K⁺).

В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых образцов. Время внесения образцов не должно превышать 20 мин при использовании всех лунок планшета.

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 1 час при температуре (24-26) °С в термошейкере с интенсивностью перемешивания 400 об/мин.

7.10. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства рекомендуется по окончании инкубации отобрать при помощи дозатора содержимое лунок с пробамии клещей, а затем промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3) с использованием промывочного устройства, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата. Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.12. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 1 час при температуре (24-26) °С в термошейкере с интенсивностью перемешивания 400 об/мин.

7.13. По окончании инкубации промыть планшет как описано в п. 7.10.

7.14. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7.15. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение без использования референс-фильтра.

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.2. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит.}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср.К^-} + 0,25$$

где: $ОП_{ср.К^-}$ — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом, измеренное в двухволновом режиме 450/620–655 нм (или только с фильтром 450 нм).

9.3. Оценка результатов:

– среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,25 ед. опт. плотн.

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 1,8 ед. опт. плотн.

9.4. Только при соблюдении положений п. 9.3 можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Результат анализа считать положительным, если $ОП_{обр} \geq ОП_{крит.}$

Результат анализа считать отрицательным, если $ОП_{обр} < ОП_{крит.}$

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения образцов; раствор тетраметилбензидина; контрольные образцы; конъюгат и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

10.5. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.6. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, раствор ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

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

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, р. п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64, 227-75-40

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Нач. лаборатории маркеров
вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест»



И.Н. Кувшинова

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"



Масяго А.В.

20 22 г.