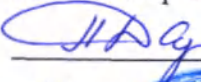


«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

« 01 » _____ 2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
норовирусов геногрупп I и II**

(Норовирус-антиген-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Норовирус-антиген-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления антигена норовируса геногрупп I и II методом твердофазного иммуноферментного анализа в фекалиях больных острыми гастроэнтеритами и контактных лиц.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 определений, включая контроли, или 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. В лунках планшета иммобилизованы специфические антитела к антигенам разных генотипов вируса. Во время первой инкубации при добавлении в лунки планшета исследуемого образца и биотинилированных моноклональных антител к норовирусу происходит связывание антител, иммобилизованных на внутренней поверхности лунок, и биотинилированных антител с антигенами норовируса. После промывки во время второй инкубации вносят конъюгат стрептавидин-пероксидазы, который связывается с биотинилированными моноклональными антителами к норовирусу, иммобилизованными в ходе первой инкубации.

Комплекс «антиген–биотинилированное антитело–конъюгат» выявляют цветной ре-

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Руквишиниковым, нач. лаборатории маркеров вирусных инфекций И.Н. Кувшиновой

акцией с использованием субстрата пероксидазы–перекиси водорода и хромогена–тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена норовируса в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными моноклональными антителами к антигену норовируса, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) – буферный раствор, содержащий рекомбинантный антиген норовируса человека, готовый для использования – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец (K^-) – буферный раствор, не содержащий антиген норовируса человека, готовый для использования – 1 фл., 2,5 мл;
- конъюгат №1, концентрат (биотинилированные моноклональные антитела к норовирусу) – 1 фл., 1,5 мл;
- конъюгат №2, концентрат (стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена) – 1 фл., 1,5 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 1 (РРК №1) – 1 фл., 13 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 2 (РРК №2) – 1 фл., 13 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- раствор для образцов (РО), концентрат – 1 фл., 20 мл;
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 фл., 12 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагента – 3 шт.;
- наконечниками для пипеток на 5-200 мкл – 24 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфическая активность.

Набор должен выявлять антиген норовируса в реакции иммуноферментного анализа в СОП⁺ (СОП⁺ НВ-антиген (рег. № 05-2-472), аттестованный ОБТК АО «Вектор-Бест») и положительном контрольном образце (K^+); и не выявлять в отрицательном контрольном образце (K^-).

Титр антигена норовируса в СОП⁺ должен быть не менее 1:128.

Среднее значение оптической плотности отрицательного контрольного образца (ОП_{срК⁻}) не должно превышать 0,2; значение положительного контрольного образца (ОП_{срК⁺}) должно быть не ниже 1,0.

Диагностическая чувствительность выявления норовирусов I и II геногруппы: клинические испытания, проведенные на 132 положительных образцах фекалий, показали 100% чувствительность (интервал 98%-100%).

Диагностическая специфичность выявления норовирусов I и II геногруппы: клинические испытания, проведенные на 131 отрицательном образце фекалий, показали 100% специфичность (интервал 98%-100%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (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 клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или 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 (H₂O₂, деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует прово-

дять 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» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм;
- термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °С;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл (погрешность не более 5 %);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 до 350 мкл (погрешность не более 5 %);
- промыватель для планшетов автоматический или ручной;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- пробирки вместимостью 1,5 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы фекалий человека

Для выявления антигена норовируса в фекалиях предварительно приготовить экстракт 20 %-ной суспензии фекалий на рабочем растворе для образцов (см. п. 7.5.). Образцы фекалий собрать в стерильные флаконы (пробирки) с пробкой вместимостью 10 мл. Фекалии в количестве 1 г ($\frac{1}{4}$ флакона) встряхнуть с 5,0 мл рабочего раствора для образцов до получения гомогенной взвеси, центрифугировать при 3000 об/мин в течение 30 мин. Исследуют надосадочную жидкость. Для выявления АГ норовируса можно использовать как свежеприготов-

ленные образы, так и хранившиеся при температуре от 2 до 8 °С в течение 24 часов, либо замороженный при минус 20°С в течение не более 3 месяцев.

Полученные экстракты допускается хранить до анализа не более 24 ч при температуре от 2 до 8°С или до 3 мес. при температуре минус 20 °С и ниже. При необходимости многократного исследования, экстракты следует разделить на несколько порций, чтобы избежать повторного замораживания.

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 60 мин.

7.2. Подготовка планшета

Непосредственно перед использованием вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов; остальные стрипы снять с рамки и немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы после первого вскрытия пакета можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Положительный и отрицательный контрольные образцы (K^+ и K^-) даны в рабочем разведении и не требуют дополнительного разведения.

7.4. Приготовление промывочного раствора

Содержимое флакона с концентратом ФСБ-Т добавить к 672 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать.

В случае дробного использования набора отобрать из флакона необходимое количество концентрата ФСБ-Т и развести дистиллированной водой в соотношении 1:25 (1 часть концентрата на 25 частей дистиллированной воды).

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°С не более 5 суток.

7.5. Приготовление рабочего раствора для образцов

Содержимое флакона с концентратом раствора для образцов добавить к 480 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать.

В случае дробного использования набора отобрать из флакона необходимое количество концентрата раствора для образцов и развести дистиллированной водой в соотношении 1:24 (1 часть концентрата на 24 части дистиллированной воды).

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

Приготовленный рабочий раствор для разведения образцов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата № 1

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в чистый флакон, используя чистые наконечники, внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата № 1 и соответствующее количество концентрата конъюгата № 1, тщательно перемешать.

Таблица расхода реагентов

Количество одновременно используемых стрипов	Раствор ТМБ, мл	Рабочий раствор конъюгата №1		Рабочий раствор конъюгата №2	
		Конъюгат, концентрат №1, мл	Раствор для разведения конъюгата №1, мл	Конъюгат, концентрат №2, мл	Раствор для разведения конъюгата №2, мл
1	1,0	0,1	1,0	0,1	1,0
2	2,0	0,2	2,0	0,2	2,0
3	3,0	0,3	3,0	0,3	3,0
4	4,0	0,4	4,0	0,4	4,0
5	5,0	0,5	5,0	0,5	5,0
6	6,0	0,6	6,0	0,6	6,0
7	7,0	0,7	7,0	0,7	7,0
8	8,0	0,8	8,0	0,8	8,0
9	9,0	0,9	9,0	0,9	9,0
10	10,0	1,0	10,0	1,0	10,0
11	11,0	1,1	11,0	1,1	11,0
12	12,0	1,2	12,0	1,2	12,0

Рабочий раствор конъюгата № 1 можно хранить при температуре от 18 до 25 °С в течение 6 ч после приготовления.

7.7. Приготовление рабочего раствора конъюгата № 2

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в чистый флакон, используя чистые наконечники, внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата № 2 и соответствующее количество концентрата конъюгата № 2, тщательно перемешать.

Рабочий раствор конъюгата № 2 можно хранить при температуре от 18 до 25 °С в течение 6 ч после приготовления.

7.8. Подготовка раствора тетраметилбензидина

Раствор ТМБ готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов), отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ.

Остатки раствора тетраметилбензидина из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).

7.9. В лунки стрипа, например 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 подготовленных исследуемых образцов.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех стрипов планшета.

7.10. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата № 1 (см п. 7.6).

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

7.11. Планшет заклеить плёнкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре 37 ± 1 °С.

7.12. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить её в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.4.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку внести 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. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

Внимание! Промывку при помощи автоматического промывателя рекомендуется проводить в режиме с переполнением («Overflow») с 5-ю циклами промывки и внесением в лунки по 600–700 мкл промывочного раствора.

7.13. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата № 2 (см п. 7.7).

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

7.14. Планшет заклеить плёнкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 ± 1 °С.

7.15. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 5 раз, так как описано в п. 7.12.

7.16. Во все лунки внести по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см п. 7.8). Планшет поместить в защищённое от света место и выдержать в течение 25 мин при темпе-

ратуре от 18 до 25 °С.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620 - 655 нм. Допускается измерение оптической плотности при длине волны 450 нм.

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать значения оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОПК⁻) и значение ОП в лунке с положительным контрольным образцом (ОПК⁺, ОП_{ср}К⁺).

Результаты исследований учитывают только при соблюдении следующих условий:

– среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОП_{ср} К⁻) не более 0,20;

– значение ОП в лунке с положительным контрольным образцом (ОП_{ср} К⁺) не менее 1,0.

9.2. Для оценки результатов анализа вычислить критическое значение оптической плотности (ОП_{крит}) по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}} (\text{К}^-) + 0,2,$$

где: ОП_{ср} (К⁻) – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.3. Результат анализа считают положительным, если значение оптической плотности в лунке с исследуемым образцом равно или превышает ОП_{крит} (ОП_{обр} ≥ ОП_{крит}).

9.4. Результат анализа считают отрицательным, если значение оптической плотности в лунке с исследуемым образцом ниже ОП_{крит} (ОП_{обр} < ОП_{крит}).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

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;

- положительный и отрицательный контрольные образцы можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

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

- концентрат конъюгата № 1, концентрат конъюгата № 2; раствор тетраметилбензидина, раствор для разведения конъюгата № 1 и раствор для разведения конъюгата № 2 после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- рабочий раствор конъюгата № 1 и рабочий раствор конъюгат № 2 можно хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 6 часов;

- промывочный раствор и рабочий раствор для образцов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех 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 «Норовирус-антиген-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 336-73-46, 363-57-95, тел./факс (383) 336-60-30.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Нач. лаборатории
маркеров вирусных инфекций



И.Н. Кувшинова

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"

Масяго А.В.
" 09 09 20 21 г.

