

Копия верна

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 21.02 2014 г. № 1047



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2013 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения индекса авидности иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови
(ВектоРубелла-IgG-Авидность)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВектоРубелла-IgG-Авидность» (далее по тексту – набор) предназначен для определения индекса авидности иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Выявление иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи с высокой константой связывания вирусного антигена (высокой авидностью) и иммуноглобулинов класса G с низкой константой связывания (низкой авидностью) путем определения индекса авидности может быть использовано с целью диагностики острой или ранее перенесенной инфекции.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 48 исследуемых образцов, включая контроли. Дробное использование набора позволяет проведение 6 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках параллельных рядов с иммобилизованным антигеном. Имеющиеся в сыворотке специфические антитела к вирусу связываются с иммобилизованным антигеном, формируя комплекс «антиген-антитело». На второй стадии, после внесения белок-диссоциирующего агента в один из параллельных рядов, происходит диссоциация комплексов «антиген-антитело», включающих IgG с более низкими константами связывания (низкой авидностью). На третьей стадии связавшиеся антитела взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител против IgG человека с пероксидазой хрена. Комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляется реакцией с субстратом пероксидазы – перекисью водорода и хромогеном – тетраметилбензидином. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках стрипов.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором НИИСД М.П. Гришаевым и инженером-лаборантом лаборатории герпес-вирусных инфекций О.М. Красман

Интенсивность окраски пропорциональна количеству связанных в комплекс IgG к вирусу краснухи в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном вируса краснухи, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^{+}_{BA}) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащий высокоавидные IgG к вирусу краснухи, готовый для использования – 1 флакон (2,0 мл);
- положительный контрольный образец (K^{+}_{HA}) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащий низкоавидные IgG к вирусу краснухи, готовый для использования – 1 флакон (2,0 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^{-}) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к вирусу краснухи, готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (12 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 флакона (по 28 мл);
- раствор сравнения (PC) – 1 флакон (8,0 мл);
- раствор белок-диссоциирующего агента (БДА) – 1 флакон (8,0 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления высокоавидных иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи – соответствие результатов определения набором индекса авидности IgG к вирусу краснухи требованиям стандартных образцов предприятия, содержащих высокоавидные и низкоавидные IgG к вирусу краснухи (рег. № 05-2-93), аттестованных ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» - 100%.

3.2. Специфичность выявления низкоавидных иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи – соответствие результатов определения набором индекса авидности к вирусу краснухи требованиям стандартной образцов предприятия, содержащих высокоавидные и

низкоавидные IgG к вирусу краснухи (рег. № 05-2-93), аттестованных ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» - 100%.

3.3. Диагностическая специфичность выявления высокоавидных иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 37 высокоавидных образцах, показали 100% специфичность (интервал 92%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.4. Диагностическая специфичность выявления низкоавидных иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 45 низкоавидных образцах, показали 100% специфичность (интервал 94%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ от 06.06.12 № 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 указаний 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 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 (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и 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;

– термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ C$;

– холодильник бытовой;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл (погрешность не более 5%);

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл (погрешность не более 5%);

– промывочное устройство для планшетов;

– перчатки резиновые хирургические;

– флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 $^\circ C$ не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации. Полученные образцы можно замораживать/оттаивать только один раз, т.к. повторное замораживание/оттаивание может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать. Замороженные образцы хранить при температуре минус 20 $^\circ C$ (и ниже) не более 6 мес.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить

центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °С.

6.4. Для отбора исследуемых образцов и компонентов набора реагентов использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, 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 и хранить при температуре от 2 до 8°С в течение срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

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

7.4. Подготовка контрольных образцов

Контрольные образцы (K^+_{BA} , K^+_{HA} , K^-) готовы к использованию.

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

7.5. Предварительное разведение исследуемых образцов.

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать. При разведении сыворотки красный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет образца меняется незначительно.

Предварительно разведенные исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови хранить не более 3 ч при температуре от 18 до 25 °С.

7.6. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор конъюгата утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента поместить в защищенное от света место.

Оставшийся после проведения ИФА раствор тетраметилбензидина утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).

Раствор ТМБ после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Количество используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор (однократный ФСБ-Т)	
			ФСБ-Т, концентрат, мл	Вода дистиллированная, мл
2	2,0	2,0	4,0	до 100
4	4,0	4,0	8,0	до 200
6	6,0	6,0	12,0	до 300
8	8,0	8,0	16,0	до 400
10	10,0	10,0	20,0	до 500
12	12,0	12,0	24,0	до 600

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

7.9. Внесение контрольных образцов и исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови в предварительном разведении.

В лунки стрипов внести попарно по 100 мкл контрольных образцов для прямого (нечетные стрипы) и диссоциирующего (четные стрипы) ИФА. Например, в лунки А-1, А-2 и В-1, В-2 – К⁻, в лунки С-1, С-2 – К⁺_{НА}, в лунки и D-1, D-2 – К⁺_{ВА}. В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток, затем попарно в соседние лунки двух стрипов

внести по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов, тщательно перемешать (см. схему).

Схема

	1	2	3	4	5	6
A	K ⁻	K ⁻	сыв. 5	сыв. 5	сыв.13	сыв.13
B	K ⁻	K ⁻	сыв.6	сыв.6	сыв.14	сыв.14
C	K ⁺ _{HA}	K ⁺ _{HA}	сыв.7	сыв.7	сыв.15	сыв.15
D	K ⁺ _{BA}	K ⁺ _{BA}	сыв. 8	сыв. 8	сыв.16	сыв.16
E	сыв. 1	сыв. 1	сыв.9	сыв.9	сыв.17	сыв.17
F	сыв.2	сыв.2	сыв. 10	сыв. 10	сыв.18	сыв.18
G	сыв.3	сыв.3	сыв.11	сыв.11	сыв.19	сыв.19
H	сыв. 4	сыв. 4	сыв. 12	сыв. 12	сыв.20	сыв.20
	PC	БДА	PC	БДА	PC	БДА

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

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

7.10. По окончании инкубации снять липкую пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 400 мкл промывочного раствора (см п. 7.3). Процесс промывки повторить еще 1 раз. Общее количество отмывок равно 2. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.11. Во все лунки для прямого ИФА внести по 100 мкл раствора сравнения. Во все лунки для диссоциирующего ИФА внести по 100 мкл белок-диссоциирующего агента.

Заклеить планшет пленкой и инкубировать в течение 15 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7.12. По окончании инкубации содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 3 раза промывочным раствором, как описано в п. 7.10.

7.13. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата (см п. 7.6.). Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37±1 °С.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

7.14. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 5 раз, так как описано в п. 7.10.

7.15. Во все лунки внести по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

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

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм, при этом выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

Измерение проводить не позднее 5 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом в прямом ИФА ($ОП_{ср}K^-_{\text{прям ИФА}}$).

9.1.1. Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) в прямом ИФА:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}K^-_{\text{прям ИФА}} + 0,1 \quad (1)$$

9.1.2. Вычислить индексы авидности $K_{ВА}^+$ и $K_{НА}^+$ по формуле:

$$ИА = \frac{ОП_{\text{дисс ИФА}}}{ОП_{\text{прям ИФА}}} \times 100\%, \text{ где} \quad (2)$$

$ОП_{\text{дисс ИФА}}$ – оптическая плотность в лунках с белок-диссоциирующим агентом (БДА);

$ОП_{\text{прям ИФА}}$ – оптическая плотность в лунках с раствором сравнения (РС).

9.2. Среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,20 ($ОП_{ср}K^-_{\text{прямой ИФА}} \leq 0,20$ о.е.).

Значение индекса авидности $K_{ВА}^+$ должно быть более 60% ($ИА K_{ВА}^+ > 60\%$);

Значение индекса авидности $K_{НА}^+$ должно быть не более 40% ($ИА K_{НА}^+ < 40\%$).

Только в случае соблюдения указанных условий можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.3. На основании полученных данных для исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови с $ОП_{\text{прям ИФА}} \geq ОП_{крит}$, вычислить индекс авидности по формуле 2 (см п. 9.1.2.).

9.4. Значение $ИА < 40\%$ указывает на наличие низкоавидных антител;

значение $ИА > 60\%$ указывает на наличие высокоавидных антител;

значение $ИА$ в интервале 40-60 % – пограничный результат.

9.5. Если ОП исследуемого образца выше динамического диапазона измеряемой прибором

оптической плотности, измерить величину оптической плотности в лунках стрипов на длине волны 405 нм (референс-фильтр 620-655 нм).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ 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. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

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

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

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор сравнения, раствор белок-диссоциирующего агента и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- контрольные образцы, конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

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

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

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, раствор для предварительного разведения сывороток), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «ВекторРубелла-IgG-Авидность», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 363-20-60, 227-75-43, тел./факс (383) 363-13-46, 363-35-55.

E-mail: vbobik@vector-best.ru

Инженер-лаборант
ЗАО «Вектор-Бест»



О.М. Красман

Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



М.П. Гришасов

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



А.В. М'сяго

2021 г.