

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2020 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса М к вирусу Крымской-Конго
геморрагической лихорадки в сыворотке (плазме) крови
(ВектоКрым-КГЛ-IgM)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу Крымской-Конго геморрагической лихорадки в сыворотке (плазме) крови «ВектоКрым-КГЛ-IgM» (далее по тексту – набор) предназначен для качественного выявления иммуноглобулинов класса М (IgM) к вирусу Крымской-Конго геморрагической лихорадки в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Набор может быть использован для диагностики Крымской-Конго геморрагической лихорадки.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы. Возможно дробное использование набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения IgM к вирусу Крымской-Конго геморрагической лихорадки (К-КГЛ) основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации происходит связывание IgM (в том числе IgM к вирусу К-КГЛ), содержащихся в исследуемых образцах, с иммобилизованными на поверхности лунок планшета моноклональными антителами к IgM человека. Во время второй инкубации, связавшиеся IgM к вирусу К-КГЛ взаимодействуют с добавленным в лунки рекомбинантным антигеном вируса К-КГЛ, находящемся в ком-

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, начальником лаборатории герпес-вирусных инфекций М.П. Кандрушиной и ведущим специалистом лаборатории герпес-вирусных инфекций О.А. Шварёвой.

плексе с конъюгатом поликлональных антител к вирусу К-КІІІ с пероксидазой хрена. Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием раствора тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgM к вирусу

К-КІІІ в анализируемых образцах. Реакцию останавливают стоп-реагентом и измеряют оптическую плотность (ОП) в лунках планшета

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) <i>Описание.</i>	Кол-во
Планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к IgM человека	1 шт.
Положительный контрольный образец (К⁺) <i>Содержит IgM к вирусу К-КІІІ</i> <i>Содержит натрия азид (0,12 %), ProC'lin 300 (0,02 %).</i>	1 фл., 1,5 мл
Отрицательный контрольный образец (К⁻) <i>Не содержит IgM к вирусу К-КІІІ</i> <i>Содержит натрия азид (0,12 %), ProC'lin 300 (0,02 %).</i>	1 фл., 3,0 мл
Конъюгат <i>Смесь рекомбинантного антигена вируса К-КІІІ с конъюгатом поликлональных антител к вирусу К-КІІІ с пероксидазой хрена.</i> <i>Содержит, ProC'lin 150 (0,0088 %), фенол (0,025 %), ProC'lin 300 (0,03 %).</i>	1 фл., 13,0 мл
Раствор для разведения сывороток (PPC) <i>Содержит ProC'lin 300 (0,005 %)</i>	1 фл., 12,0 мл
Раствор для предварительного разведения сывороток (PIPPC) <i>Содержит ProC'lin 300 (0,02 %).</i>	1 фл., 10,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твинном (ФСБ-Т×25) <i>Содержит ProC'lin 300 (0,25 %).</i>	2 фл., по 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) <i>Содержит 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (0,025 %).</i>	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент <i>Содержит кислоту серную (4,9 %).</i>	1 фл., 12,0 мл
Планшет разборный для предварительного разведения исследуемых образцов	1 шт.
Плёнки для заклеивания планшета	2 шт.
Накопечники для дозаторов на 2-200 мкл	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая чувствительность выявления IgM к вирусу К-КІІІ: клинические испытания, проведенные на 131 положительном образце от 81 пациента, показали 100 % чувствительность (интервал 96,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %):

3.2. Диагностическая специфичность выявления IgM к вирусу К-КІІІ: клинические испытания, проведенные на 145 отрицательных образцах от 95 пациентов, показали 100 % специфичность (интервал 96,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.3. Аналитическая специфичность:

Для оценки аналитической специфичности были проанализированы образцы сывороток

крови от пациентов с потенциально перекрестно-реактивными вирусными инфекциями (геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), клещевой энцефалит (ВКЭ), лихорадка Западного Нила (ЛЗН)). Перекрестно реагирующих образцов обнаружено не было.

3.4. Воспроизводимость результатов: клинические испытания, проведенные на 131 положительном и 145 отрицательных образцах с использованием двух серий набора реагентов, показали 100 % межсерийную воспроизводимость результатов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Стоп-реагент и раствор ТМБ обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора ТМБ на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды. Некоторые компоненты содержат ProClin 300, ProClin 150, фенол, кислоту серную, натрия азид, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2 «Состав набора».

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми и контрольными 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 клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, 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, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при одной длине волны - 450 нм;

– термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;

- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- дозаторы одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 10 до 5000 мкл;
- дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 10 до 300 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором, Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013, СП 3.1.3310-15 «Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами», СП 3.1.7.3148-13 «Профилактика крымской геморрагической лихорадки», МУК 4-2-3007-12 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики Крымской геморрагической лихорадки для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» и МУ 3.1.3.2488-09 «Организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий против Крымской геморрагической лихорадки».

6.2. Для анализа использовать образцы сыворотки крови человека или образцы плазмы крови, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия или ЭДТА.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови следует хранить при температуре (2-8) °С не более 5 суток или при температуре минус 18 °С и ниже, если требуется более длительное хранение.

После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сыворотки или плазмы крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

6.5. Образцы, содержащие гемоглобин в концентрации до 2 мг/мл, билирубин в концентрации до 0,2 мг/мл, триглицериды в концентрации до 20 мг/мл пригодны для использования.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18–26) °С не менее 30 мин.

- При дробном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре (2–8) °С, использовать в течение всего срока годности. Допускается хранение ФСБ-Т×25 и стоп-реagenta при температуре (2–30) °С.

- Необходимо избегать воздействия прямого солнечного света на раствор ТМБ при подготовке и проведении ИФА.

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

- Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

- Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

- При использовании автоматического устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов; в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% этиловом спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.

- Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

- В случае повторного использования посуду (ванночки) для копьютата необходимо

промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом, а затем дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду (ванночки) дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

- Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

- Запрещается повторное использование планшета для предварительного разведения исследуемых образцов.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Переменать содержимое флакона с ФСБ-Тх25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его при температуре (30–40) °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Тх25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или при (18-26) °С не более 7 суток.

7.4. Конъюгат.

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

7.5. Раствор ТМБ.

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

7.6. Подготовка исследуемых образцов.

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РПРС). Для этого внести в лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельных образцов сыворотки (плазмы), тщательно перемешать.

При разведении сыворотки красный цвет РПРС должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

Хранение: 10-тикратно разведенные образцы можно хранить не более 3 ч при температуре (18- 26) °С.

Таблица расхода компонентов

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
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.7. Контрольные образцы (K^+ , K^-) и стоп-реагент готовы к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Внимание! Раствор для разведения сывороток перед употреблением встряхнуть!

8.1. В любые две лунки, например, А-1 и В-1, внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), в одну лунку, например, С-1, – 100 мкл положительного контрольного образца (K^+).

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 7.6.), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемый образец разбавляется в 100 раз.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин.

Стрипы заклеймить пленкой и инкубировать 60 мин в термостате при температуре (37±1) °С.

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.4.), заклеить стрипы пленкой и инкубировать 90 мин в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

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

8.4. По окончании второй инкубации промыть лунки, как указано в п. 8.2.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ (см. п. 7.5.) и инкубировать в защищённом от прямого солнечного света месте 25 мин при температуре $(18-26)^\circ\text{C}$.

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

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

8.7. Измерить величину оптической плотности (ОП) растворов в лунках на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм. Допускается измерение при одной длине волны - 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($\text{ОП}_{\text{ср. К}^-}$).

9.2. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- среднее значение ОП в лунках с К^- не более 0,25;
- значение ОП в лунке с К^+ не менее 1,0.

9.3. Вычислить критическое значение оптической плотности ($\text{ОП}_{\text{крит}}$) по формуле:

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

9.4. Результат анализа считается положительным, если $\text{ОП}_{\text{обр.}} > \text{ОП}_{\text{крит.}}$.

Результат анализа считается отрицательным, если $\text{ОП}_{\text{обр.}} < 0,8 \times \text{ОП}_{\text{крит.}}$.

Результат анализа считается неопределённым, если $0,8 \times \text{ОП}_{\text{крит.}} \leq \text{ОП}_{\text{обр.}} \leq \text{ОП}_{\text{крит.}}$,

где: $\text{ОП}_{\text{обр.}}$ – значение оптической плотности в лунке с исследуемым образцом.

В случае неопределённого результата рекомендуется повторно исследовать эти образцы параллельно с образцами данных пациентов, взятыми через 3–7 дней.

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 $(2-8)^\circ\text{C}$. Допускается транспортирование при температуре до 26°C не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ 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. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. Набор предназначен для однократного применения.

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 «ВектоКрым-КГЛ-IgM», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, а/я 121,

тел. (383) 227-67-64, (383) 363-57-95.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Ведущий специалист лаборатории
герпес-вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

О.А. Шварёва

Начальник лаборатории
герпес-вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

М.П. Кандрушина

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Р.А. Максютлов





В данном документе
прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 9 листов

девятью
прописью

Зав. ОБГК М.П. Бодунов М.П. Бодунов
должность, подпись