

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов
класса G к вирусу Варицелла-Зостер в сыворотке (плазме) крови
(ВектоVZV-IgG)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВектоVZV-IgG» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу Варицелла-Зостер (IgG к VZV), в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа и может быть использован в клинике для диагностики заболеваний, обусловленных VZV, а также для проведения сероэпидемиологических исследований.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные образцы, допускается 12 независимых постановок ИФА по 8 образцов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Специфическим реагентом набора является очищенный рекомбинантный антиген VZV, иммобилизованный на поверхности лунок полистиролового разборного планшета.

На первой стадии анализа анализируемые образцы инкубируют в лунках с иммобилизованным антигеном. Имеющиеся в образце специфические антитела к вирусу связываются с иммобилизованным антигеном.

Связавшиеся антитела выявляют при инкубации с конъюгатом антител к иммуноглобулинам класса G человека с пероксидазой хрена. Комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к VZV в анализируемом образце.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИСД М.Ю. Руквишниковым и начальником лаборатории герпес-вирусных инфекций М.П. Кандрушиной.

После добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение оптической плотности при длине волны 450 нм.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном VZV, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащий IgG к VZV; готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к VZV, готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);
- конъюгат антител против IgG человека с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,5 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 флакона (по 28 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения конъюгата (РПК) – 1 флакон (13 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 5-200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет разборный для предварительного разведения исследуемых образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления IgG к VZV – соответствие результатов определения набором IgG к VZV требованиям стандартной панели предприятия, содержащей и не содержащей иммуноглобулины класса G к VZV (рег. № 05-2-262), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест».

3.2. Чувствительность выявления IgG к VZV – соответствие результатов определения набором IgG к VZV требованиям стандартной панели предприятия, содержащей и не содер-

жащей иммуноглобулины класса G к VZV (рег. № 05-2-262), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест».

3.3. Диагностическая чувствительность: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 141 положительном образце, показали 100% чувствительность (доверительный интервал 98%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.4. Диагностическая специфичность: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 30 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (доверительный интервал 90%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (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 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 (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 оптической плотности только при одной длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- 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 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 мутную, гемолизированную сыворотку крови, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 14 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре ми-

нус 20°C (и ниже) не более 6 мес.

Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

7.2. Подготовка планшета.

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

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

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 °C до полного растворения осадка.

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

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

7.4. Подготовка положительного контрольного и отрицательного контрольного 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. Предварительное разведение исследуемых образцов.

В лунки планшета разборного 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.

Хранить не более 3 ч при температуре от 18 до 25 °C.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

В зависимости от числа используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Приготовленный рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 часов.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в пластиковую ванночку для реагента и 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 можно хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

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

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл	Конъюгат, концентрат	РРК	
1	2,0	До 50	0,1	1,0	1,0
2	4,0	до 100	0,2	2,0	2,0
3	6,0	до 150	0,3	3,0	3,0
4	8,0	до 200	0,4	4,0	4,0
5	10,0	до 250	0,5	5,0	5,0
6	12,0	до 300	0,6	6,0	6,0
7	14,0	до 350	0,7	7,0	7,0
8	16,0	до 400	0,8	8,0	8,0
9	18,0	до 450	0,9	9,0	9,0
10	20,0	до 500	1,0	10,0	10,0
11	22,0	до 550	1,1	11,0	11,0
12	24,0	до 600	1,2	12,0	12,0

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

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

7.9. 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 90 мкл раствора для разведения сывороток (РРС) и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки крови, перемешать пипетированием. Раствор для разведения сывороток перед употреблением встряхнуть!

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.10. 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 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.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Планшет заклеить пленкой и выдержать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

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

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

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

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

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

7.14. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, 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 (выведение спектрофотометра на нулевой уровень осуществлять по воздуху).

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. Оценка результатов:

– среднее 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 0,7 ед. опт. плотн.

9.3. Только при соблюдении положений п. 9.2 можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

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

$$ОП_{крит} = ОП_{срК^-} + 0,30$$

где: $ОП_{срК^-}$ — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

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

Результат анализа считать отрицательным, если $ОП_{обр} \leq 0,8 \times ОП_{крит}$.

Результат анализа считать неопределенным, если $0,8 \times ОП_{крит} < ОП_{обр} < ОП_{крит}$.

При неопределенном результате анализа рекомендуется повторить анализ такой сыворотки.

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. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С (12 мес.). Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. 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;

– контрольные образцы, концентрат конъюгата и раствор ТМБ после вскрытия флаконов 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, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор для разведения сывороток, раствор для разведения конъюгата 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 суток.

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

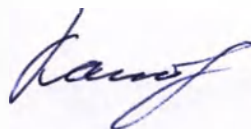
10.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор для предварительного разведения сывороток), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «ВектоVZV-IgG», следует обращаться в АО «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: vbobtk@vector-best.ru

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



М.П. Кандрушина

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.