

КОПИЯ

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора



Р.А. Максютов

«21» июля 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител
класса G к антигенам поксвирусов «Вектор ИФА Покс-IgG»
по ТУ 21.10.60-096-05664012-2022»

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора

Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител класса G к антигенам поксвирусов «Вектор ИФА Покс-IgG» по ТУ 21.10.60-096-05664012-2022.

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

«Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител класса G к антигенам поксвирусов «Вектор ИФА Покс-IgG» по ТУ 21.10.60-096-05664012-2022» (далее по тексту – набор) предназначен для качественного выявления иммуноглобулинов класса G (IgG) к антигенам поксвирусов в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа как вспомогательное средство при диагностике поксвирусной инфекции, для установления факта перенесенной ранее инфекции и для проведения обследования населения с целью оценки уровня популяционного иммунитета.

1.3 Область применения набора

Клиническая лабораторная диагностика.

Только для диагностики ин витро.

1.4 Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Только для профессионального использования.

Показания: в соответствии с назначением набора.

Противопоказаний и побочных эффектов при работе с набором не выявлено.

Набор предназначен только для однократного применения по назначению.

Набор является нестерильным медицинским изделием.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Состав набора

Набор реагентов применяется для ручной постановки анализа.

В состав набора реагентов входят:

Шифр	Наименование реагента	Кол-во, объем
ИС	Иммуносорбент – планшет разборный (12 восьмилучных стрипов) с сорбированным очищенным на сахарозе природным антигеном вируса осповакцины, штамм ЛИВП	1 шт.
К+	Положительный контрольный образец, содержащий IgG к антигенам поксвирусов, инаktivированный	1 фл., 1,5 мл

К-	Отрицательный контрольный образец, не содержащий антител к поксвирусам, инаktivированный	1 фл., 2,0 мл
Кг	20-кратный концентрат моноклональных мышиных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена	1 фл., 0,7 мл
РПР-С	Раствор для предварительного разведения исследуемых образцов	1 фл., 10,0 мл
РБР-С	Буферный раствор для разведения исследуемых образцов	1 фл.; 10,0 мл
РБР-К	Буферный раствор для разведения конъюгата	1 фл., 13,0 мл
ТМБ	Хромоген тетраметилбензидин	1 фл., 0,7 мл
БРС	Субстратный буферный раствор с перекисью водорода для разведения хромогена	1 фл., 13,0 мл
ФСБ-Т (концентрат x25)	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином	1 фл., 26,0 мл
СТОП-реагент	Стоп-реагент, 1 М раствор серной кислоты	1 фл., 6,0 мл
-	Планшет разборный для предварительного разведения исследуемых образцов	1 шт.
-	Пленка для заклеивания планшета	3 шт.
-	Ванночка для реагентов	4 шт.

В состав набора входит эксплуатационная документация: инструкция по применению.

П р и м е ч а н и е: Паспорт (аналитический лист) на серию должен входить в комплект сопроводительной документации на продукцию. Число экземпляров (копий) паспорта каждой серии, входящих в комплект сопроводительной документации, должно быть определено в договоре на поставку продукции.

Набор реагентов упаковывают в картонную пачку. Вторичной упаковкой может быть коробка картонная. В этом случае картонную пачку и инструкцию по применению вкладывают в коробку.

П р и м е ч а н и е - Ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются иммуносорбент и конъюгат, основными характеристиками которых для конечного пользователя являются параметры инкубаций и последующих отмывок, составляющие 60 мин для первой и 30 мин для второй инкубации при 700 об/мин и температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ с пятикратной отмывкой после каждой. Данные характеристики реализуются с помощью применения поверенных термошейкера и вошера, следовательно, их соблюдение является строго обязательным.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор рассчитан на 96 определений, включая контрольные образцы. Для исследования малых партий образцов возможно проведение 12 постановок ИФА по 8 образцов, включая контрольные.

Набор комплектуется всеми необходимыми реагентами, кроме воды очищенной.

2.3 Метод исследования

Метод выявления антител класса G к антигенам поксвирусов основан на использовании твердофазного иммуноферментного анализа.

Основой набора является: иммуносорбент, на поверхности лунок которого иммобилизован очищенный на сахарозе природный антиген вируса осповакцины, штамм ЛИВП (инв.№ V-401 в коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

На первой стадии анализа, исследуемые и контрольные образцы инкубируют с компонентами, сорбированными в лунках планшета-иммуносорбента. В случае наличия в исследуемом образце специфических антител происходит образование иммунных комплексов «антиген-антитело».

На второй стадии анализа, после отмывки, образовавшиеся на первой стадии иммунные комплексы «антиген-антитело-конъюгат» выявляют добавлением выбранного для конкретных целей исследования конъюгата, не связавшиеся молекулы конъюгата удаляют отмывкой.

Визуализация результата происходит при добавлении в лунки иммуносорбента рабочего раствора хромогена на основе тетраметилбензидина (ТМБ). В результате взаимодействия пероксидазы с субстратом (перекись водорода) в присутствии ТМБ развивается окрашивание раствора, интенсивность окрашивания зависит от количества выявленных иммунных комплексов по закону логарифма.

После измерения оптической плотности в лунках планшета на основании значения $OP_{\text{крит}}$, исследуемые образцы могут быть оценены как положительные или отрицательные.

2.4 Ограничения метода

Ни один из известных методов тестирования не может дать полной гарантии положительного и отрицательного результата анализа. ИФА, являясь высокочувствительным методом, имеющим в основе сложные химические реакции, может давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты.

Несоблюдение процедур, описанных в пункте 7.1 настоящей инструкции, может значительно сказаться на результатах анализа, привести как к ложноположительным, так и к ложноотрицательным результатам.

На раннем этапе инфекции специфические IgG присутствуют в очень низких концентрациях, соответственно, отрицательный результат может показывать, что тестируемый образец не содержит детектируемого набором реагентов их количества. Образцы с КП в диапазоне от 0,8 до 1,2 могут содержать критически малое значение аналита, на нижнем пороге его обнаружения, доноры таких образцов подлежат наблюдению во временной динамике.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитические характеристики

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирской области) в рамках исследования эффективности набора.

3.1.1 Аналитическая чувствительность (Предел обнаружения (LoD))

При разведении положительного образца № 1 рабочей панели образцов «РП- IgG(+/-)POX» (или аналогичного по содержанию антител) в 100 раз, результат анализа был положительный.

3.1.2 Аналитическая специфичность

Все отрицательные согласно паспорта образцы рабочей панели «РП- IgG(+/-)POX» интерпретированы как отрицательные.

Все положительные согласно паспорта образцы рабочей панели «РП- IgG(+/-)POX» должны интерпретированы как положительные.

3.1.3 Повторяемость и воспроизводимость

Повторяемость установлена исследованием коэффициента вариации оптических плотностей (ОП) всех образцов рабочей панели «РП- IgG(+/-)POX» в 4 повторях.

Коэффициент вариации не более 8 %.

Воспроизводимость установлена исследованием коэффициента вариации ОП повторов положительного образца № 1 рабочей панели «РП- IgG(+/-)POX».

Коэффициент вариации не более 8 %.

3.2 Диагностические характеристики

Исследования диагностических характеристик набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р.п. Кольцово, Новосибирской области).

3.2.1 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность выявления IgG к поксвирусам: клинические испытания, проведенные на 145 положительных образцах, показали чувствительность 100 % (98,5 % – 100 %) с доверительной вероятностью 95 %.

3.2.2 Диагностическая специфичность

Для оценки диагностической специфичности (перекрестной реактивности) в клинических испытаниях использовали 309 образцов сыворотки крови от пациентов с другими гетерологичными заболеваниями и доноров крови: инфекция, вызванная вирусом *Varicella Zoster*, вирусом кори, вирусом краснухи, вирусом простого герпеса первого типа, вирусом парагриппа 1-3, грипп А и В, инфекция, вызванная респираторно-синцитиальным вирусом, риновирусная инфекция; ВИЧ – инфекция, аденовирусная инфекция, инфекция вызванная человеческим метапневмовирусом, бактериальная пневмония вызванная *Streptococcus pneumoniae*, инфекция вызванная энтеровирусом *Enterovirus 71*, коронавирусная инфекция вызванная SARS-CoV-2; цитомегаловирусом, вирусом Эпштейн-Барра; бактериальная пневмония и бронхит вызванные *Chlamydomphila pneumoniae*, HBV-инфекция, HCV-инфекция, инфекция вызванная *Mycobacterium tuberculosis*; донорские сыворотки крови в том числе с гиперлипидемией, иктеричные и гемолизированные образцы. Перекрестно реагирующих образцов обнаружено не было. Клинические испытания показали специфичность 100 % (98,5 % – 100 %) с доверительной вероятностью 95 %.

3.2.3 Интерферирующие вещества

Подтверждено отсутствие влияния гемоглобина в концентрации до 1000 мг/дл, билирубина в концентрации до 15 мг/дл, триглицеридов в концентрации до 700 мг/дл на результаты исследования.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

В связи с тем, что в семейство поксвирусов (*Poxviridae*) входят вирусы натуральной оспы и оспы обезьян, которые отнесены к I группе патогенности. Поэтому работа с материалом подозрительным на зараженность этими вирусами должна проводиться в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МР 3.1.0290-2022 «Противоэпидемические мероприятия, направленные на предупреждение возникновения и распространения оспы обезьян».

Все работы по отбору проб от больных, транспортировке и все этапы лабораторного исследования проводятся в строгом соответствии с требованиями СП 3.3686-21 «Сани-

тарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», МУ 3.4.2552-09 «Организация и проведение первичных противоэпидемических мероприятий в случаях выявления больного (трупа), подозрительного на заболевания инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные;
- инаktivировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии с санитарными правилами СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»;
- неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, отходы после анализа следует удалять в соответствии с требованиями СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации дезинфектантом или пероксидазой хрена, содержащейся в Кг, исследуемых проб, помещений и оборудования.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.1 Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов необходимо участие специалистов не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончивших соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-IV групп патогенности, не имеющих противопоказаний к применению средств профилактики и лечения и к работе в средствах индивидуальной защиты.

Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

При работе с набором реагентов соблюдать требования «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Утв. МЗ СССР 17 января 1991 г.) и ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности». Все реагенты набора, за исключением СТОП-реагента, являются нетоксичными. Серная кислота, входящая в состав СТОП-реагента, обладает раздражающим действием. При попадании СТОП-реагента на кожу и слизистые, промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Исследование проводят на приборах:

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерение оптической плотности растворов в лунках планшета иммуносорбента при длине волны 450 нм;
- термостатируемый шейкер с частотой вращения до 900 об/мин, поддерживающий температуру (37±1) °С;
- устройство для промывки лунок планшетов иммуносорбентов промывочным раствором.

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в лаборатории с бактерицидной лампой, установленной в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

- дозаторы полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 до 1000 мкл;
- дозатор полуавтоматический многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкостей до 300 мкл.

5.4 Другое используемое оборудование

- центрифуга для микропробирок до 12000 об/мин;
- встряхиватель пробирок;
- штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;
- холодильник бытовой;
- морозильная камера от минус 15 до минус 25°C.

5.5 Лабораторная посуда

- цилиндр мерный второго класса точности вместимостью до 100 мл;
- цилиндр мерный второго класса точности вместимостью до 1000 мл;
- емкости для сброса наконечников и микропробирок;
- наконечники с аэрозольным барьером.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл;
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 300 мкл;
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 1000 мкл;
- отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;
- комплект средств для обработки рабочего места.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Получение и обработка биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность поксвирусом, не являются частью процедуры анализа с использованием набора и осуществляется в соответствии СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

6.1 Тип исследуемых образцов

Материалом для исследований служат образцы сыворотки или плазмы крови человека.

6.2 Процедура получения биологического материала

Получение биологического материала и его транспортирование проводится в соответствии с МУ 3.4.2552-09 «Организация и проведение первичных противозидемических мероприятий в случаях выявления больного (трупа), подозрительного на заболевания инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения», СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и МР 3.1.0290-2022 «Противозидемические мероприятия, направленные на предупреждение возникновения и распространения оспы обезьян».

В качестве проб для диагностического исследования используют:

- сыворотка крови;
- плазма крови из цельной венозной крови с антикоагулянтами К2ЭДТА, К3ЭДТА, гепарин или цитрат натрия;

Отбор проб, упаковку и транспортирование осуществляют в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Взятие крови следует производить одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в специальную вакуумную систему из локтевой вены не менее 0,5 мл согласно инструкции производителя. После взятия крови пробирку следует несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась.

Сразу после взятия пробы пробирки маркируют, указывая номер или штрих-код. Остальные сведения должны содержаться в сопроводительной карточке или электронном протоколе.

После формирования сгустка или фракционирования на плазму и клеточный осадок, отобрать жидкое содержимое в отдельную промаркированную емкость для хранения.

Для исключения ложноположительных результатов анализируемые образцы готовить и хранить в условиях, исключающих возможность бактериального пророста. Необходимо осветлять анализируемые образцы, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования в течение 15 мин при частоте вращения 3000 об/мин. Не использовать анализируемые образцы с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией.

Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания анализируемых образцов.

После завершения сбора и подготовки образцов все инструменты и подсобные материалы, а также использованные средства индивидуальной защиты (перчатки, халат и пр.) дезинфицируют согласно требованиям СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Допускается исследование образцов сыворотки или плазмы крови, хранившихся не более семи суток при температуре от 2 до 8 °С, или не более шести месяцев при температуре минус 20 °С.

Перед исследованием образцы, хранившиеся в холодильнике/морозильной камере, разморозить при температуре от 17 до 27 °С и тщательно перемешать.

Минимальный объем исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови равен 10 мкл.

Антикоагулянты (гепарин, К2ЭДТА, К3ЭДТА, цитрат натрия) не влияют на результаты анализа.

6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала:

При сборе клинического материала необходимо учитывать влияние интерферирующих веществ (эндогенных и экзогенных), которые могут встречаться в клинических образцах и давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты.

- Эндогенные факторы: гемоглобин в концентрации более 1000 мг/дл, билирубин в концентрации более 15 мг/дл, триглицериды в концентрации более 700 мг/дл.

- Экзогенные факторы: амино- и хлорсодержащие средства дезинфекции.

Непригодными для исследования являются:

- образцы сыворотки или плазмы крови, содержащие гемоглобин в концентрации более 1000 мг/дл, билирубин в концентрации более 15 мг/дл, триглицериды в концентрации более 700 мг/дл.;

- образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток и подвергшиеся заморозке.

Сведения о других интерферирующих веществах, при условии соблюдения правил взятия исследуемого материала, указанных в инструкции, отсутствуют.

6.4 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Транспортирование отобранного клинического материала в лабораторию для исследований и его хранение проводят при температуре от 2 до 8 °С совокупно не более семи суток, или при температуре минус 20 °С совокупно не более шести месяцев, в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

6.5 Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие вирусов натуральной оспы и оспы обезьян, должны осуществляться в соответствии с действующими СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Клинический материал, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал утилизируют по классу В, как чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы в соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями 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» (СанПиН 2.1.3684-21) и СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1 Требования, несоблюдение которых может привести к искажению результатов анализа

7.1.1 Не использовать реагенты с истекшим сроком годности.

7.1.2 Мерный цилиндр и емкость для приготовления промывочного раствора, многогорловые емкости для подготовки реагентов к работе должны быть тщательно вымыты и промыты водой очищенной, желательна их стерилизация.

7.1.3 При ручной промывке, планшет промывать, полностью заполняя лунки иммуносорбента (300 мкл в лунку), не допуская переливания промывочного раствора через края лунок, и не касаясь лунок наконечниками. Время между заполнением лунок раствором и удалением из лунок раствора должно быть не менее 45 секунд. По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок.

При использовании автоматического устройства, планшет промывать с объемом наполнения 400 мкл в лунку. Время между заполнением лунок раствором и удалением из лунок раствора должно быть не менее 45 секунд. Необходимо настроить оборудование на минимальное время вакуума при аспирации во избежание высушивания лунок планшета. Установить забор жидкости из центра лунки при выполнении аспирации. Не осуществлять режим придонной промывки (bottom wash). Не использовать две программы промывки подряд. Режим перекрестной аспирации «Crosswise» может применяться только в завершаю-

щем цикле отмытки. Не допускать вспенивания промывочного раствора ограничением скорости его потока при заполнении лунок. Для настройки работы промывателя и удовлетворительной воспроизводимости результата, обращаться к уполномоченному сервисному инженеру.

7.1.4 Не допускать высыхания лунок иммуносорбента между отдельными операциями.

7.1.5 Ванночки, в случае повторного использования для работы с растворами конъюгата и рабочего раствора хромогена, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами. При повторном использовании ванночки для конъюгатов промыть проточной водой и тщательно ополоснуть водой очищенной. При повторном использовании ванночку для рабочего раствора хромогена сразу после работы промыть 70 % раствором этилового спирта и тщательно ополоснуть водой очищенной. Никогда не использовать одну и ту же ванночку для раствора конъюгата и рабочего раствора хромогена.

7.1.6 При использовании автоматического устройства для промывки планшета-иммуносорбента необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста. Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать раствором 70 % этилового спирта и затем водой очищенной.

7.1.7 Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только раствором 70 % этилового спирта, не использовать во время проведения ИФА перекись водорода или хлорамин, другие содержащие активный кислород, активный хлор вещества.

7.1.8 Для дезинфекции и утилизации отходов реагентов набора, вспомогательных материалов и исследуемых образцов, рекомендуется использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА (которые не содержат активные кислород и хлор, ионы тяжелых металлов). Рекомендуются средства на основе спиртов или четвертичных аммониевых соединений.

7.1.9 Лунки планшета для предварительного разведения и пленка для заклеивания лунок иммуносорбента являются одноразовыми и повторному использованию не подлежат. При использовании части набора необходимо отрезать кусок пленки нужного размера для каждой стадии инкубации.

7.2 Приготовление реагентов

Перед ИФА все компоненты набора реагентов необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 17 до 27 °С.

Перед использованием содержимое флаконов перемешать.

7.2.1 Приготовление иммуносорбента- планшета ИС

Вскрыть упаковку иммуносорбента. Подготовить необходимое для работы количество стрипов. Оставшиеся вынуть из рамки и упаковать в пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыв пластиковую застежку.

Хранение: неиспользованные стрипы иммуносорбента хранить в пакете с влагопоглотителем в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2.2 Приготовление промывочного раствора

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т (концентрат x25), развести его водой очищенной согласно Таблице 1 и тщательно перемешать. При использовании целого флакона ФСБ-Т (концентрат x25) развести его содержимое в 25 раз водой очищенной и тщательно перемешать.

Хранение: промывочный раствор в чистой плотно закрытой емкости не более 5 суток при температуре от 17 °С до 27 °С. Неиспользованный ФСБ-Т (концентрат x25) в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2.3 Приготовление СТОП-реагента

СТОП-реагент готов к применению. В соответствии с числом используемых стрипов отобрать в ванночку необходимое количество согласно Таблице 1.

Хранение: неиспользованный СТОП-реагент в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2.4 Подготовка К+, К-, РПР-С, РБР-С, РБР-К и БРС

К+, К-, РПР-С, РБР-С, РБР-К, Кг и БРС готовы к использованию.

Перед использованием содержимое флаконов тщательно перемешать.

Хранение: неиспользованные РПР-С, РБР-С, РБР-К, Кг и БРС в закрытых флаконах в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2.5 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Для приготовления рабочего раствора конъюгата необходимо смешать один объем Кг с 20 объемами РБР-К.

Хранение:

- рабочий раствор конъюгата не более 48 часов до использования при температуре от 4 °С до 27 °С;

- неиспользованные Кг, РБР-К в закрытых флаконах в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2.6 Приготовление рабочего раствора хромогена

Избегать попадания под прямые солнечные лучи.

В ванночку отобрать необходимый объем ТМБ в зависимости от количества используемых стрипов согласно Таблице 1. Добавить к нему соответствующий объем БРС, тщательно перемешать. Очередность внесения в ванночку ТМБ и БРС не влияет на результаты анализа.

Хранение: рабочий раствор хромогена не более 4 часов после приготовления при температуре от 4 °С до 27 °С в защищённом от света месте, неиспользованные ТМБ и БРС в закрытых флаконах в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

Таблица 1 - Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
На приготовление промывочного раствора												
ФСБ-Т, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Вода очищенная, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Готовые к применению реагенты												
РПР-С, мл	0,8	1,6	2,4	3,2	4,0	4,8	5,6	6,4	7,2	8,0	8,8	9,6
РБР-С, мл	0,8	1,6	2,4	3,2	4,0	4,8	5,6	6,4	7,2	8,0	8,8	9,6
СТОП-реагент, мл	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
На приготовление рабочего раствора конъюгата												
Кг, мл	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6
РБР-К, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
На приготовление рабочего раствора хромогена												
ТМБ, мл	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6
БРС, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

7.2.7 Подготовка исследуемых образцов

Перед проведением анализа каждый исследуемый образец развести в РПР-С в соотношении 1:10. Для этого в лунку планшета разборного для предварительного разведения исследуемых образцов внести 90 мкл РПР-С и добавить 10 мкл исследуемого образца. Раствор перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РПР-С должен измениться от красного до синего.

Хранение: разведенные образцы до 2 ч при температуре от 17 °С до 27 °С.

8 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА)

8.1 Процедура иммуноферментного анализа

Перед проведением анализа все реагенты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 17 °С до 27 °С. Перед использованием содержимое флаконов перемешать.

8.1.1 Приготовить иммуносорбент, как описано в п. 7.2.1. Приготовить раствор конъюгата, раствор хромогена как описано в п. 7.2.5. и п. 7.2.6. Внести во все предназначенные для исследуемых образцов лунки иммуносорбента ИС по 90 мкл РБР-С.

Внесение положительного и отрицательного контролей: в одну любую пустую лунку внести 100 мкл К+, в две другие пустые лунки внести по 100 мкл К-. При постановке ИФА на одном или двух стрипах такая схема постановки контролей обязательна. При одновременной постановке анализа на двух и более планшетах такая схема постановки контролей обязательна для каждого планшета.

В лунки с 90 мкл РБР-С внести по 10 мкл предварительно разведенных в РПР-С исследуемых образцов как описано в п. 7.2.7, тщательно перемешав пипетированием. Таким образом рабочее разведение образцов 1:100. Все лунки иммуносорбента заклеить пленкой.

Иммуносорбент инкубировать 60 мин в термошейкере при 700 об/мин и температуре (37 ± 1) °С.

8.1.2 По окончании инкубации содержимое лунок иммуносорбента собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором и удалить влагу как описано в п. 7.1.3 и п. 7.1.4.

8.1.3 Приготовить рабочий раствор конъюгата как описано в п. 7.2.5. Во все лунки иммуносорбента внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. При ручной постановке учитывать требования п. 7.1.5. Все лунки иммуносорбента заклеить пленкой.

Иммуносорбент инкубировать 30 мин в термошейкере при 700 об/мин и температуре (37 ± 1) °С.

8.1.4 По окончании инкубации содержимое лунок иммуносорбента собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором и удалить влагу как описано в п. 7.1.3 и п. 7.1.4.

8.1.5 Приготовить рабочий раствор хромогена как описано в п. 7.2.6.

Во все лунки иммуносорбента внести по 100 мкл рабочего раствора хромогена. При ручной постановке учитывать требования п. 7.1.5. Все лунки иммуносорбента заклеить пленкой. Защищенный от света иммуносорбент инкубировать 15 мин в термошейкере (без шейкирования) при температуре (37 ± 1) °С.

8.1.6 Реакцию остановить добавлением во все лунки иммуносорбента по 50 мкл стоп-реагента.

Время между остановкой реакции и регистрацией результатов не должно превышать 15 мин.

8.2 Регистрация результатов

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) с фильтром 450 нм и референс-фильтром 620-650 нм. Допускается измерение при длине волны 450 нм. В этом случае выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9 РАСЧЕТЫ

9.1 Соблюдение условий при учете результатов

Результаты анализа учитывать только при соблюдении следующих условий:

- 1) Значение ОП в лунке с **К+** более 0,500 о.е.
- 2) Каждое значение ОП в лунках с **К-** (ОП **К-**) менее 0,200 о.е.

9.2 Интерпретация результатов ИФА

Для интерпретации результатов рассчитать **ОП(К-)_{ср.}** по формуле:

$$\text{ОП(К-)}_{\text{ср.}} = (\text{ОП(К-)}_1 + \text{ОП(К-)}_2) / 2 \quad (1),$$

где **ОП(К-)_{ср.}** – среднее значение ОП в лунках с **К-**;

ОП(К-) – значение оптической плотности в лунке с **К-**.

Затем рассчитать значение **ОП_{крит.}** по формуле:

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

где **ОП_{крит.}** – критическое значение оптической плотности.

Считать образец положительным если:

ОП образца равна или более ОП_{крит} ($\text{ОП}_{\text{образца}} \geq \text{ОП}_{\text{крит.}}$).

Считать образец отрицательным если:

ОП образца менее ОП_{крит} ($\text{ОП}_{\text{образца}} < \text{ОП}_{\text{крит.}}$).

Для исследуемых образцов дополнительно можно рассчитать **КП_{образца}** по формуле:

$$\text{КП}_{\text{образца}} = \text{ОП}_{\text{образца}} / \text{ОП}_{\text{крит}} \quad (3),$$

где **КП_{образца}** — коэффициент позитивности образца.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Условия хранения набора

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.

10.2 Условия транспортирования набора

Транспортировать набор реагентов следует крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) в соответствии с ТУ 21.10.60-096-05664012-2022 при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнере. Допускается транспортирование при температуре до 27 °С не более пяти суток. Не допускать замораживания. Набор реагентов, транспортируемый с нарушением температурного режима применению не подлежит.

10.3 Срок годности набора

Срок годности набора реагентов «Вектор ИФА Покс-IgG» составляет 12 месяцев с даты изготовления набора. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых компонентов изделия – в течение срока годности набора реагентов при температуре от 2 °С до 8 °С (см. 7.2). Срок годности предварительно разведенных исследуемых образцов, промывочного раствора, рабочих растворов конъюгата и хромогена – на условиях и длительностью не более указанных в 7.2. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные флаконы, планшеты, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей диагностической лаборатории собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, удаляют из помещения с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и 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».

Наборы с истекшим сроком годности, вскрытые, но не использованные наборы, а также наборы с поврежденной упаковкой, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.3684-21).

10.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «Вектор ИФА Покс-IgG» направлять на предприятие-изготовитель Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), 630559, Россия, Новосибирская область, рабочий поселок Кольцово, тел.: +7 (383) 336-60-10, факс: +7 (383) 336-74-09.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

11 АНАЛИЗ НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ И (ИЛИ) НЕОПУБЛИКОВАННЫХ ДАННЫХ И СООБЩЕНИЙ, СООТНЕСЕННЫХ С ПРЕДНАЗНАЧЕННЫМ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ ПРИМЕНЕНИЕМ ИСПЫТУЕМОГО МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ И ПРЕДЛАГАЕМЫМ МЕТОДОМ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Род *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* широко известен двумя представителями – вирусом натуральной оспы, возбудителем одного из наиболее опасных вирусных инфекционных заболеваний человека, и вирусом осповакцины, с помощью которого глобальная кампания по ликвидации натуральной оспы увенчалась успехом. В состав рода также входят такие патогенные для человека зоонозные ортопоксвирусы, как вирусы оспы обезьян и

Ныне актуальна детекция случаев заболевания оспой обезьян, которая является редким вирусным зоонозным заболеванием (вызываемым вирусом, передающимся человеку от животных), симптомы которого у человека схожи с симптомами, наблюдавшимися в прошлом у пациентов с натуральной оспой, однако являются менее тяжелыми.

Заражение человека происходит в результате прямого контакта с кровью, биологическими жидкостями, а также пораженной кожей или слизистой инфицированных животных и воздушно-капельным путем при длительном личном контакте.

Инкубационный период (период времени от инфицирования до появления симптомов) оспы обезьян обычно составляет от 6 до 16 дней, но может колебаться от 5 до 21 дня.

Основные клинические симптомы: сильная головная боль, подъем температуры, боли в мышцах, увеличение лимфатических узлов, кожная сыпь чаще всего появляется на лице, ладонях и ступнях.

Восприимчивостью к вирусу оспы обезьян обладает ряд различных видов животных, среди которых полосатые белки, древесные белки, гамбийские крысы, сони и нечеловекообразные приматы. Естественная история вируса оспы обезьян остается неясной, и для определения точного резервуара вируса и механизма его поддержания в природе необходимы дальнейшие исследования.

Оспа обезьян представляет собой заболевание, имеющее значение для общественного здравоохранения на глобальном уровне, поскольку оно затрагивает не только страны Западной и Центральной Африки, но и весь мир. Первая за пределами Африки вспышка оспы обезьян произошла в 2003 г. в Соединенных Штатах Америки, а источником инфицирования стал контакт с зараженными домашними луговыми собачками. Животные содержались вместе с ввезенными из Ганы гамбийскими крысами и сонями. В ходе вспышки в США было зарегистрировано 70 случаев оспы обезьян. Случаи инфицирования оспой обезьян также регистрировались у лиц, прибывших из Нигерии в Израиль (сентябрь 2018 г.), Соединенное Королевство (сентябрь 2018 г., декабрь 2019 г., май 2021 г. и май 2022 г.), Сингапур (май 2019 г.) и Соединенные Штаты Америки (июль и ноябрь 2021 г.). В мае 2022 г. из нескольких неэндемичных по вирусу стран поступили сообщения о случаях заболевания оспой обезьян. В настоящее время ведутся исследования эпидемиологии вируса, источников заражения и путей распространения.

Появление и развитие вакцинологии связано, в первую очередь, с поисками способов защиты от оспы. В настоящее время мы знаем, что этиологическими агентами оспы, оспы коров, оспы лошадей являются близкородственные вирусы, относящиеся к роду *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*. Ортопоксвирусы антигенно близки друг другу и дают перекрестные серологические реакции и иммунную защиту. Благодаря международной

кампании по строгому эпидемиологическому надзору за оспой и противооспенной вакцинации, выполнявшейся под эгидой Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) с 1958 г., оспу удалось полностью ликвидировать и зарегистрировать последний природный случай данного заболевания в октябре 1977 г. [Fenner F., et al., 1988.].

Известно, что антительный ответ на противооспенную вакцинацию играет решающую роль в защите от последующей вирусной инфекции [Moss B.2011; Albarnaz J.D., 2018; Belyakov I.M. et al., 2003]. Показано, что при вируснейтрализующем титре антител в сыворотке крови вакцинированных людей от 1:32 и выше обеспечивается надежная защита от оспенной инфекции [Mask T.M. et al, 1972]. Поскольку при массовой противооспенной вакцинации вирусом осповакцины в небольшом проценте случаев наблюдались тяжелые побочные реакции, иногда завершавшиеся летальным исходом, после глобальной ликвидации оспы ВОЗ рекомендовала такую вакцинацию прекратить.

Единственным эффективным методом борьбы с возрастающей угрозой ортопоксвирусных инфекций человека является вакцинопрофилактика. Однако накопление в последние десятилетия иммунодефицитных состояний (ВИЧ-инфекция; пациенты, перенесшие трансплантацию органов; онкобольные и др.) привело к тому, что массовая вакцинация населения классической живой вакциной сейчас противопоказана. Поэтому существует настоятельная потребность в создании современных живых вакцин, которые должны быть значительно безопаснее по сравнению с классической противооспенной вакциной.

Суммируя результаты исследований при создании новых осповакцин, можно заключить, что при создании безопасных и высокоиммуногенных вариантов необходимо соблюдать баланс между аттенуацией и иммуногенностью. Поскольку имеющийся уровень знаний не позволяет заранее предсказать эффекты, которые будут достигнуты при нарушении нескольких целевых генов вируса осповакцины, каждый получаемый вариант вируса следует тщательно изучать. Выявить наиболее эффективный вариант вакцины и в дальнейшем установить контроль за эффективностью процесса вакцинации поможет исследование методом иммуноферментного анализа титров образовавшихся специфических антител. Набор реагентов, позволяющий выявлять IgG к вирусу осповакцины у вакцинированных, имеет перспективу стать основным орудием исследования индуцированного иммунитета.

Литература:

1. International Committee on Taxonomy of Viruses – www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp.
2. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм:

национальная и глобальная угроза. // *Вестник Российской Академии Наук.* – 2003. – Т. 73, № 3. – С. 195-204.

3. Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. – М.: KMK Scientific Press Ltd., 1998. – 386 с.

4. Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А. Нужно быть готовыми к возврату оспы. // *Вопросы вирусологии.* – 2019. – Т. 64, № 5. – С. 206-214.

5. Максютков Р.А. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, 2017 г.

6. Щелкунов С. Н., Щелкунова Г. А. Гены, влияющие на иммуногенность вируса осповакцины. // *Acta Naturae* – 2020. – Т. 12, №1 (44). – С. 34-41.

7. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/monkeypox>.

8. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization – 1988 - 1460 p

9. Moss B. // *Immunol. Rev.* – 2011 - V. 239. P. 8–26.

10. Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. // *Viruses.* – 2018 - V. 10. e101.

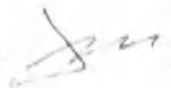
11. Belyakov I.M., Earl P., Dzutsev A., Kuznetsov V.A., Lemon M., Wyatt L.S., Snyder J.T., Ahlers J.D., Franchini G., Moss B., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003 - V. 100. P. 9458–9463.

12. Mack T.M., Noble J., Thomas D.B. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1972 - V. 21. P. 214–218.

Ведущий научный сотрудник

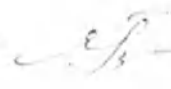
отдела «Коллекция микроорганизмов»

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

 С.А. Пьянков

Зав. ОБТК

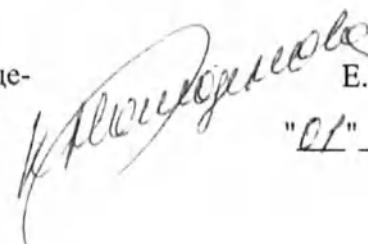
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

 М.П. Богрянцева

СОГЛАСОВАНО

Старший научный сотрудник отдела диагностики инфекционных болезней, к.б.н.

ФКУН РосНИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора

 Е.В. Найденова

"01" июня 2022 г.