

Копия верна

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 15 сентября 2013 г. № 1845-П/13

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«15 сентября» 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса М к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови

(ВектоРубелла-IgM)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВектоРубелла-IgM» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови человека, и может быть использован для диагностики первичного инфицирования вирусом краснухи методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Особую опасность краснуха представляет для беременных вследствие внутриутробной инфекции плода. Частота поражений плода зависит от сроков беременности. Заболевание краснухой в первый триместр беременности наиболее опасно и обуславливает врожденные уродства у будущего ребенка в 60% случаев. Это – задержка в развитии, поражения зрения и слуха, врожденные пороки сердца, поражения костей конечностей, черепа и др. Поэтому рекомендуется проведение систематического серологического анализа у женщин репродуктивного возраста для выявления группы риска (с отсутствием антител к вирусу краснухи).

1.3. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли, допускается 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

На первой стадии ИФА анализируемые образцы инкубируют в лунках с

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

иммобилизованным антигеном вируса краснухи. Имеющиеся в сыворотке специфические антитела к вирусу связываются с иммобилизованным антигеном. На второй стадии связавшиеся антитела выявляют при инкубации с конъюгатом антител к IgM человека с пероксидазой хрена.

Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна концентрации IgM к вирусу краснухи в анализируемом образце.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности антигеном вируса краснухи, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K+) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащей IgM к вирусу краснухи, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K-) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, не содержащий IgM к вирусу краснухи, готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgM 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 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 – 2 шт.;
- ванночкой для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 5-200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфическая активность:

3.1.1. чувствительность выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу краснухи – соответствие результатов качественного определения набором IgM к вирусу краснухи требованиям стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-92), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест»: значения оптической плотности в лунках с положительными сыворотками $ОП_{№9-№16} \geq ОП_{крит}$;

3.1.2. специфичность выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу краснухи – соответствие результатов качественного выявления набором IgM к вирусу краснухи требованиям стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-92), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест»: значения оптической плотности в лунках с отрицательными сыворотками $ОП_{№1-№8} \leq 0,8 \times ОП_{крит}$.

3.1.3. Диагностическая чувствительность: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 86 положительных образцах, показали 100% чувствительность (интервал 96%-100% , с доверительной вероятностью 95%).

3.1.4. Диагностическая специфичность: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 54 отрицательных образцах, взятых у доноров, отобранных случайным образом, показали 96% специфичность (интервал 87,0%-99,6%, с доверительной вероятностью 95%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

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».

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 со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5-5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости от 5 до 350 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы стеклянные вместимостью 10-15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 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°C не более 5 суток или при температуре минус 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 60 мин.

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 с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего 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 °C 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°C не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного и отрицательного контрольных образцов.

Положительный и отрицательный контрольные образцы готовы к использованию.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °C 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 крови хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч.

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.

Количество используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т×25, мл	Вода дистиллированная., мл
1	1,0	1,0	2,0	до 50
2	2,0	2,0	4,0	до 100
3	3,0	3,0	6,0	до 150

4	4,0	4,0	8,0	до 200
5	5,0	5,0	10,0	до 250
6	6,0	6,0	12,0	до 300
7	7,0	7,0	14,0	до 350
8	8,0	8,0	16,0	до 400
9	9,0	9,0	18,0	до 450
10	10,0	10,0	20,0	до 500
11	11,0	11,0	22,0	до 550
12	12,0	12,0	24,0	до 600

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

7.9. В лунку А-1 внести 100 мкл положительного контрольного образца (K^+).

В лунки В-1, С-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-).

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток (РРС), добавить по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови, перемешать пипетированием. Раствор для разведения сывороток перед использованием встряхнуть!

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин при использовании всех лунок планшета.

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 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 4 раза. Общее количество отмывок равно 5. 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. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

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

Для внесения 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 ТМБ.

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

Для внесения раствора ТМБ 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 («бланк»)) 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 ($ОП_{cp. K^-}$).

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

$$ОП_{крит} = ОП_{cp. K^-} + 0,35$$

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

9.3. Оценка результатов:

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,7;

– среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,25 ед. опт. плотн.

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

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 $0,8 \times ОП_{крит} < ОП_{обр} < ОП_{крит}$.

где $OP_{обр.}$ – оптическая плотность исследуемого образца.

В случае неопределенного результата рекомендуется повторно проанализировать эти образцы параллельно с сыворотками данных больных, взятыми через 7–15 дней.

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. Замораживание компонентов набора не допускается.

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

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности.

В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете 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;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор для разведения сывороток и стоп-реагент 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.

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

10.6. 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 «ВектоРубелла-IgM», 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. Гришаев

Прошнуд овано, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.
Директо : по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"

А.В. Масаго
" Вектор-Бест " 202 0 г.

