ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного
количественного и качественного определения
иммуноглобулинов класса G к вирусу кори в сыворотке (плазме) крови
(ВектоКорь-IgG)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВектоКорь-IgG предназначен для иммуноферментного количественного и качественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу кори в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Выявление иммуноглобулинов класса G к вирусу кори может быть использовано для диагностики заболевания, вызванного вирусом кори, для проведения сероэпидемиологических исследований, а также для контроля вакцинации против кори.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа при количественном определении: в дубликатах 41 неизвестного, 6 калибровочных, 1 контрольного образцов; при качественном определении: 90 неизвестных образцов и 3 калибровочных образцов в дубликатах; всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантного антигена вируса кори. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца сыворотки крови во время первой инкубации происходит связывание IgG к вирусу кори с рекомбинантным антигеном вируса кори, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок планшета. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена связывается с IgG к вирусу кори, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Далее, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации IgG к вирусу кори в анализируемых пробах.

После измерения величины оптической плотности растворов в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация IgG к вирусу кори в анализируемых пробах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности рекомбинантным антигеном вируса кори, готовый для использования – 1 шт.;

– калибровочные образцы на основе инактивированной сыворотки крови, содержащие известные количества IgG к вирусу кори — 0; 0,15; 0,5; 1; 2; 5 МЕ/мл, концентрации IgG к вирусу кори в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 1,5 мл);

– контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека с известным содержанием IgG к вирусу, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);

– конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10 мл);

– раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12 мл);

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 флакона (по 28 мл);

– раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), 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.;

– трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

– планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG к вирусу кори в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «ВектоКорь-IgG» не превышает 8%.

3.2. Линейность. Зависимость концентрации IgG к вирусу кори в образцах сывороток крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей IgG к вирусу кори, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0,15-5 МЕ/мл и составляет 90-110%.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.3. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации IgG к вирусу кори предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 0,5 МЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.4. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация IgG к вирусу кори не превышает 0,07 МЕ/мл.

3.5. Специфическая активность:

чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу кори – соответствие результатов выявления набором иммуноглобулинов класса G к вирусу кори требованиям стандартной панели предприятия (аттестована ОБТК АО «Вектор-Бест» СОП № 05-2-204) –составляет 100%: значения оптической плотности в лунках с положительными сыворотками $B_{9\text{-}16} \geq 1{,}2 \times B_{0{,}15}$;

специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу кори – соответствие результатов выявления набором иммуноглобулинов класса G к вирусу кори требованиям СОП № 05-2-204 – составляет 100%: значения оптической плотности в лунках с отрицательными сыворотками $B_{1\text{-}8} < 0{,}8 \times B_{0{,}15}$.

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 клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г и в методических указаниях МУ-287-113-00 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998.).

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,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

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±1) °С;

– холодильник бытовой;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл;

– промывочное устройство для планшетов;

– перчатки резиновые хирургические;

– 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 гемолизованную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 суток или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 6 мес.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. 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 °С 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 °С 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°С не более 5 суток.

7.4. Подготовка калибровочных и контрольного образцов.

Калибровочные и контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

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

7.5. Предварительное разведение исследуемых образцов.

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки крови, тщательно перемешать. При разведении сыворотки (плазмы) 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предварительно разведенные исследуемые образцы сыворотки крови можно 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 плюс.

Раствор ТМБ плюс готов к использованию.

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

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

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

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

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
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

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

7.9. Внесение калибровочных, контрольного образцов и исследуемых сывороток крови в предварительном разведении.

7.9.1. Внесение калибровочных и контрольного образцов.

7.9.1.1. Количественное определение IgG к вирусу кори:

Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл калибровочных образцов, содержащих известные количества IgG к вирусу кори — 0; 0,15; 0,5; 1; 2; 5 МЕ/мл, и по 100 мкл контрольного образца.

7.9.1.2. Качественное определение IgG к вирусу кори:

Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл калибровочных образцов, содержащих известные количества IgG к вирусу кори — 0; 0,15 и 5 МЕ/мл.

7.9.2. Внесение сывороток (плазмы) крови в предварительном разведении

Внести в остальные лунки по 90 мкл раствора для разведения сывороток, добавить (для количественного определения – в дубликатах) по 10 мкл исследуемых образцов сыворотока (плазмы) крови в предварительном разведении.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин.

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

7.11. 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.

7.12. Внести во все лунки планшета по 100 мкл конъюгата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

7.13. По окончании инкубации промыть планшет как описано в п. 7.11.

7.14. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс.

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

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

7.15. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, 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 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Количественное определение IgG к вирусу кори.

9.1.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные и контрольный образцы.

Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации IgG к вирусу кори в калибровочных образцах (МЕ/мл).

Определить содержание IgG к вирусу кори в контрольном образце по калибровочному графику.

Учёт результатов количественного определения проводить в том случае, если содержание IgG к вирусу кори в контрольном образце соответствует указанному диапазону концентраций на этикетке флакона и выполнены следующие условия:

$$ОП_0 \leq 0{,}2 \text{ о.е.};$$

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

$ОП_5 \geq 1{,}0$ о.е.;

9.1.2. Определить содержание IgG к вирусу кори в анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.1.3. Исследуемый образец сыворотки крови считать отрицательным, если концентрация IgG к вирусу кори в нем менее 0,12 МЕ/мл.

Исследуемый образец сыворотки крови считать положительным, если концентрация IgG к вирусу кори в нем более или равна 0,18 МЕ/мл.

Исследуемый образец сыворотки крови считать неопределенным, если концентрация IgG к вирусу кори в нем находится в диапазоне 0,12 ÷ 0,18 МЕ/мл.

9.1.4. Если концентрация IgG к вирусу кори в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 5 МЕ/мл, образцы следует дополнительно развести РПРС 10 раз: внести в лунки вспомогательного планшета по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл сыворотки крови в предварительном разведении (п. 7.5.), тщательно перемешать; повторить анализ и полученный результат умножить на 10.

9.2. Качественное определение IgG к вирусу кори

9.2.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные образцы.

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

$ОП_0 \leq 0{,}2$ о.е.;

$ОП_5 \geq 1{,}0$ о.е.;

где: $ОП_0$ и $ОП_5$- среднее значение оптической плотности в лунках с калибровочными образцами 0 и 5МЕ/мл соответственно.

9.3. Исследуемый образец сыворотки крови считать отрицательным, если его оптическая плотность $ОП_{сыв} < 0{,}8 \times ОП_{0,15}$.

Исследуемый образец сыворотки крови считать положительным, если его оптическая плотность $ОП_{сыв} \geq 1{,}2 \times ОП_{0,15}$.

Исследуемый образец сыворотки крови считать неопределенным, если его оптическая плотность $0{,}8 \times ОП_{0,15} \leq ОПсыв. < 1{,}2 \times ОП_{0,15}$.

где: $ОП_{0,15}$ - среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с калибровочным образцом 0,15 МЕ/мл, ед.опт. плотн.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– калибровочные и контрольный образцы, конъюгат и раствор ТМБ плюс 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 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.

10.5. 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 АО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «ВектоКорь-IgG», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru