«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«__» _____ 2022 г.
М.П.

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного количественного и качественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови «ВектоРубелла-IgG» (далее по тексту – набор) предназначен для количественного и качественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 42 исследуемых, 5 калибровочных образцов и 1 контрольного образца (при регистрации на длине волны 450 нм); 41 исследуемых, 6 калибровочных образцов и 1 контрольного образца (при регистрации на длине волны 405 нм) при количественном определении; 90 исследуемых и 3 калибровочных образцов в дублях при качественном определении (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

На первой стадии анализа калибровочные, контрольный и исследуемые образцы инкубируют в лунках стрипов с иммобилизованным антигеном вируса краснухи.

На второй стадии связавшиеся IgG выявляют при инкубации с конъюгатом антител к IgG человека с пероксидазой хрена.

Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концент-рации IgG к вирусу краснухи в анализируемых пробах.

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.;
- калибровочные образцы на основе инактивированной сыворотки крови, содержащие известные количества IgG к вирусу краснухи – 0; 10; 50; 100; 200; 800 МЕ/мл, аттестованные относительно WHO International Standard Anti Rubella Immunoglobulin, Human, NIBSC code: RUBI-1-94 – 6 фл., по 1,5 мл;
- контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови с известным содержанием IgG к вирусу краснухи, аттестованный относительно WHO International Standard Anti Rubella Immunoglobulin, Human, NIBSC code: RUBI-1-94, готовый для использования – 1 фл., 1,5 мл;
- конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) –1 фл., 10 мл;

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

– раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 фл., 12 мл;
– концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 фл., по 28 мл;
– раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
– стоп-реагент, готовый для использования – 1 фл., 12 мл;
– планшет для предварительного разведения образцов – 1 шт.

Принадлежности:
– пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
– ванночка для реагента – 2 шт.;
– наконечники для дозаторов на 2–200 мкл – 16 шт.;
– трафарет для построения калибровочного графика №1 – 1 шт.;
– трафарет для построения калибровочного графика №2 – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG к вирусу краснухи в контрольном образце не превышает 8%.

3.2.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчетной величины концентраций IgG к вирусу краснухи при разведении калибровочных образцов, содержащих 800 МЕ/мл в 4 раза; 200, 100 МЕ/мл в 2 раза; 50 МЕ/мл в 5 раз. Процент «линейности» составляет 90–110%.

3.3.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации IgG к вирусу краснухи, предписанной в контрольном образце, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 50 МЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.4.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация IgG к вирусу краснухи, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца 0 МЕ/мл ($ОП_0$) плюс 2σ (среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения $ОП_0$) не превышает 2 МЕ/мл.

3.5. Специфическая активность:

– чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи – соответствие результатов выявления набором иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи требованиям стандартной панели предприятия (СПП) (рег. № 05-2-91), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест», должна составлять 100%: значения оптической плотности в лунках с положительными образцами СПП больше или равны значению оптической плотности калибровочного образца, содержащего 10 МЕ/мл IgG к вирусу краснухи;

– специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи – соответствие результатов выявления набором иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи требованиям стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-91), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест», должна составлять 100%: значения оптической плотности в лунках с отрицательными образцами СПП меньше значения оптической плотности калибровочного образца, содержащего 10 МЕ/мл IgG к вирусу краснухи.

3.6. Диагностическая чувствительность: клинические исследования, проведенные на 123 положительных образцах сыворотки и плазмы крови, показали 100% чувствительность (интервал 98–100%).

3.7. Диагностическая специфичность: клинические исследования, проведенные на 73 отрицательных образцах сыворотки и плазмы крови, показали 99% специфичность (интервал 94–99,93%).

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 пораженный 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

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

СССР 17 января 1991 г. и в методических указаний МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назна-чения».

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 прием 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 и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются)
в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». 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 405 нм и/или 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение только при длине волны 405 нм и/или 450 нм, соответственно;
- термостат, поддерживающий температуру (37±1)°С;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5–5000 мкл
- дозаторы полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 5–300 мкл
- цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 100 и 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия, ЭДТА.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20°С (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.

6.4. Образцы сывороток крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°С.

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

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25°С не менее 60 мин.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник.

Хранение: при 2–8°С в течение срока годности набора.

7.2. Подготовка планшета

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

Хранение: при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°С до полного растворения осадка.

Хранение: при температуре от 2 до 8°С не более 5 сут.

7.4. Подготовка калибровочных и контрольного образцов

Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию.

Хранение: при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности.

7.5. Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток. Для этого внести в лунки вспомогательного планшета по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы), 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 раствора в лунке меняется незначительно.

Хранение: не более 3 ч при температуре от 18 до 25°С.

7.6. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

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

Хранение: при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс

Раствор ТМБ плюс готов к использованию.

Исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина плюс. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ плюс в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

Утилизировать раствор тетраметилбензидина плюс, оставшийся в ванночке или флаконе после проведения ИФА ***(не сливать во флакон с исходным раствором).***

Внимание! *Для работы с раствором ТМБ плюс необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ плюс, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ плюс в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спир-*

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

том и тщательно отмыть дистиллированной водой.

Хранение: при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности.

7.8. Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внесение калибровочных, контрольного и исследуемых образцов.

Для постановки **количественного** варианта анализа внести в соответствующие лунки в дублях по 100 мкл калибровочных образцов, содержащих известные количества IgG к вирусу краснухи – 0, 10, 50, 100, 200, 800 МЕ/мл при регистрации на длине волны **405 нм** или 0, 10, 50, 100, 200 МЕ/мл при регистрации на длине волны **450 нм**, и по 100 мкл контрольного образца.

Для постановки **качественного** варианта анализа внести в соответствующие лунки в дублях по 100 мкл калибровочных образцов, содержащих известные количества IgG к вирусу краснухи – 0; 10 и 200 МЕ/мл (регистрация на длине волны **450 нм**).

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и добавить (для количественного определения – в дублях) по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (см. п. 7.5.), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок планшета.

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

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 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.

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

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

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

8.4. По окончании инкубации лунки планшета промыть, как описано в п. 8.2.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс.

Для внесения раствора ТМБ плюс использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

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

8.6. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс.

8.7. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 405 нм и/или 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 405 нм и/или 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Количественное определение IgG к вирусу краснухи

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

Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации IgG к вирусу краснухи в калибровочных образцах (МЕ/мл), используя трафарет №1 (при регистрации на длине волны 450 нм)

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

или трафарет №2 (при регистрации на длине волны 405 нм).

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

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

– соотношение средних арифметических значений оптических плотностей калибровочных образцов: $ОП_0 < ОП_{10} < ОП_{50} < ОП_{100} < ОП_{200} < ОП_{800}$;

– $ОП_0 \leq 0{,}1$ о.е.; (при регистрации на длине волны 450 нм);

– $ОП_0 \leq 0{,}05$ о.е.; (при регистрации на длине волны 405 нм);

– $ОП_{200} \geq 1{,}5$ о.е. (при регистрации на длине волны 450 нм);

– $ОП_{800} \geq 0{,}7$ о.е. (при регистрации на длине волны 405 нм);

9.1.2. Определить концентрацию IgG к вирусу краснухи в исследуемых образцах по соответствующему калибровочному графику.

9.1.3. Исследуемый образец сыворотки (плазмы) крови считать **отрицательным**, если концентрация IgG к вирусу краснухи в нем менее 10 МЕ/мл.

Исследуемый образец сыворотки (плазмы) крови считать **положительным**, если концентрация IgG к вирусу краснухи в нем более или равна 10 МЕ/мл.

9.1.4. При отсутствии спектрофотометрического фильтра для измерения ОП на длине волны 405 нм для анализируемых образцов с концентрацией IgG к вирусу краснухи более 200 МЕ/мл результат следует выражать как «>200 МЕ/мл».

При использовании спектрофотометрического фильтра для измерения ОП на длине волны 405 нм, для анализируемых образцов с концентрацией IgG к вирусу краснухи более 800 МЕ/мл результат следует выражать как «>800 МЕ/мл».

9.2. Качественное определение IgG к вирусу краснухи (регистрации на длине волны 450 нм)

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:

– $ОП_0 \leq 0{,}1$ о.е.;

– $ОП_{200} \geq 1{,}5$ о.е.

где: $ОП_0$; $ОП_{200}$ – среднее значение оптической плотности в лунках с калибровочными образцами 0; 200 МЕ/мл соответственно.

9.2.2. Результат анализа **положительный**, если $ОП_{обр.} \geq ОП_{10}$.

Результат анализа **отрицательный**, если $ОП_{обр.} < ОП_{10}$.

где $ОП_{10}$ – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с калибровочным образцом 10 МЕ/мл.

9.3. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации IgG к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток.

10.2. 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.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности набора. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25), раствор для разведения сывороток, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности;
- калибровочные и контрольный образцы, конъюгат 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. 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, раствор ТМБ плюс), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

10.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

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

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район, р.п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-75-43, 227-67-64
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

Антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют.

1. Обеспечение безопасности персонала

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998).

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

2. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

– рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

– никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

– перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протереть конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона;

– используйте только одноразовые наконечники для дозаторов;

– не обрабатывайте дезинфицирующими растворами и моющими средствами посуду (ванночки), используемую для работы с конъюгатом и раствором ТМБ;

– в случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки) для раствора ТМБ ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой;

– если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

– Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.

– Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

– Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

– Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

– Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

Ложноположительные результаты могут быть обусловлены:

а) получением неправильного рабочего разведения исследуемых сывороток (например, 1:70; 1:50);

б) контаминацией отрицательных сывороток в рабочем и вспомогательных планшетах положительными сыворотками крови из соседних лунок; вероятность такой контаминации особенно высока при первичном скрининге исследуемых сывороток.

Для получения правильного рабочего разведения исследуемых сывороток необходимо:

а) при отборе 10 мкл сыворотки для предварительного разведения не погружать наконечник глубоко в сыворотку, чтобы исключить налипание сыворотки на внешнюю поверхность наконечника;

б) тщательно перемешивать сыворотку при предварительном разведении 1:10.

3. Количественное определение IgG к вирусу краснухи

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий **кусоч-**

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

но-линейной аппроксимации.

При невозможности использования специального программного обеспечения необходимо построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации IgG к вирусу краснухи в калибровочных образцах (ось абсцисс).

Построенные калибровочные графики пригодны для определения концентрации IgG к вирусу краснухи только в тех образцах, анализ которых проводили одновременно с калибровочными образцами.

При отсутствии спектрофотометрического фильтра для измерения ОП на длине волны 405 нм для анализируемых образцов с концентрацией IgG к вирусу краснухи более 200 МЕ/мл **результат следует выражать как «>200 МЕ/мл».** Для получения *оценочной концентрации* IgG к вирусу краснухи в таких образцах их следует разбавить в 3 раза РРС (к 20 мкл РРС добавить 10 мкл анализируемого образца) и повторить анализ. Вычисленное значение концентрации IgG к вирусу краснухи умножить на 3.

4. Диагностическая значимость полученных результатов

Краснуха – острое вирусное заболевание средней тяжести и достаточно редко дает тяжелые осложнения. Однако первичная инфекция опасна для беременных женщин, т.к. вирус краснухи обладает высокой проникающей способностью через плаценту и выраженным тератогенным действием. Частота поражений плода зависит от сроков беременности. Заболевание краснухой в первый триместр беременности наиболее опасно и обуславливает врожденные уродства у будущего ребенка в 60–80% случаев. Это – задержка в развитии, поражения зрения и слуха, врожденные пороки сердца, поражения костей конечностей, черепа и др. Бессимптомное течение инфекции у беременных не снижает вероятность инфицирования плода.

Поскольку в 60–70% случаев первичная краснуха протекает бессимптомно, факт инфицирования можно установить только лабораторными исследованиями.

Комплекс методов диагностики краснухи дает возможность выявлять РНК вируса краснухи, специфические IgM и IgG, определять индекс авидности IgG. Что позволяет эффективно диагностировать первичную инфекцию, реинфекцию, паст-инфекцию, подтверждать инфицирование вирусом краснухи плода и/или новорожденного, дифференцировать краснуху от кори, ветряной оспы, иерсиниоза и пр.

РНК вируса краснухи обнаруживается в носоглоточных смывах, крови, моче с 5–7 дня от контакта и в типичных случаях детектируется в течение 7–10 дней после появления высыпаний.

Специфические IgM обнаруживаются на 3–4 день после появления клинических признаков заболевания, их концентрация достигает максимального значения через 7–10 суток, и, при типичном течении инфекции, они элиминируются через 4–5 недель. Выявление специфических IgM свидетельствует о первичной инфекции. Для исключения ложноположительных результатов, обусловленных случайными ошибками при постановке анализа, необходимо проведение повторного анализа положительных сывороток. Ложноположительные результаты в непрямом методе ИФА могут быть обусловлены и наличием в испытуемой сыворотке ревматоидного фактора класса М. Увеличение концентрации IgM в парных образцах свидетельствует об острой инфекции. Если пациент обследуется в начале острой фазы заболевания, полученный отрицательный/неопределенный результат анализа на наличие специфических IgM еще не означает отсутствия инфицирования вирусом краснухи, т.к. в это время IgM к нему могут еще не появиться или быть в незначительном количестве. Поэтому рекомендуется взять кровь у пациента через 10–15 дней и вновь проанализировать ее параллельно с 1-м образцом сыворотки на наличие IgM и IgG для выявления сероконверсии и подтверждения факта инфицирования вирусом краснухи.

IgG к вирусу краснухи обнаруживаются на 5–7 день после появления клинических признаков, их концентрация достигает максимума через 4–5 недель и остается на высоком уровне длительное время.

Выявление сероконверсии или увеличения концентрации специфических IgG в образцах сывороток, взятых с интервалом 10–15 дней, свидетельствует о развитии инфекционного процесса. **При анализе парных сывороток для контроля изменения концентрации антител или наличия сероконверсии оба образца должны быть исследованы в одной постановке ИФА.**

Изменение концентрации IgG (Δ IgG) в парных сыворотках, выраженное в %, можно определить по формуле:

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

$$\Delta \text{IgG} = \frac{C_2 - C_1}{C_1} \times 100\%$$

где:С1 – концентрация IgG в первом образце;

С2 – концентрация IgG во втором образце, взятом через 10–15 дней.

Если процент увеличения концентрации IgG в парных сыворотках:

< 30% – незначительное изменение в концентрации IgG. Низкая вероятность недавней инфекции. Если все-таки подозревается острая инфекция, необходимо взять 3-й образец через 10–15 дней и проанализировать все 3 образца параллельно, чтобы убедиться в увеличении концентрации IgG.

> 30% – статистически достоверное увеличение концентрации IgG. Недавно перенесенная первичная инфекция, реинфекция или реактивация.

Следует иметь в виду, что при низкой концентрации (15–25 МЕ/мл) специфические иммуноглобулины не всегда способны обеспечить полную защиту при повторном инфицировании, и пациенты с таким уровнем концентрации IgG могут быть отнесены к группе риска в отношении реинфекции вирусом краснухи. Поэтому рекомендуется проведение систематического серологического мониторинга беременных женщин, относящихся **к группе риска (с отсутствием IgG к вирусу краснухи или с их низкой концентрацией).** Выявление IgG к вирусу краснухи и определение их концентрации может быть использовано в клинике для подтверждения диагноза краснухи, а также для проведения сероэпидемиологических исследований.

Определение индекса авидности IgG к вирусу краснухи позволяет дифференцировать первичную инфекцию от реинфекции и паст-инфекции и определить примерные сроки инфицирования, что особенно важно для беременных женщин.

Если индекс авидности менее 40%, то сыворотка содержит низкоавидные антитела, что указывает на недавно перенесенную первичную инфекцию (заболевание первичной краснухой было 2–3 месяца назад).

Если индекс авидности более 60%, то сыворотка содержит высокоавидные антитела, что указывает на ранее перенесенную (более пяти месяцев назад) инфекцию.

Индекс авидности 40–60% – «пограничная» зона, установить срок инфицирования трудно, рекомендуется взять кровь у пациента через 20–30 дней и вновь проанализировать ее параллельно с 1-м образцом сыворотки. В случае недавнего первичного инфицирования индекс авидности должен увеличиться.

5. Список использованной литературы:

1. Гришаев М.П., Смердова М.А. Краснуха и ее диагностика // Бюллетень «Новости Вектор-Бест», 2002, № 23, С. 3–7.

2. Малкова Е.М., Петрова И.Д., Смердова М.А. и др. Клинико-иммунологическая характеристика краснухи в Западной Сибири // ЖЭМИ, 2007, № 2, С. 44–48.

3. Петров В.С., Гришаев М.П., Смердова М.А., Петрова И.Д. Краснуха и ее диагностика // Сибирский консилиум, 2002, № 2, С. 52–56.

4. Антипова А.Ю. Вирус краснухи и его тератогенное действие, патогенез, клиника, диагностика, профилактика синдрома врожденной краснухи // Инфекция и иммунитет, 2011, Т. 1, № 3, С. 231–242.

5. Кицак В.Я. Вирусные инфекции беременных: патология плода и новорожденных. Кольцово: Вектор-Бест, 2004. С. 22–57.

6. Vauloup-Fellous C., Grangeot-Keros L. Humoral immune response after primary rubella virus infection and after vaccination // Clinical and Vaccine Immunology, May 2007, P. 644–647.

6. Краткая схема проведения ИФА для набора «ВектоРубелла-IgG»

Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!

Качественный анализ:

Внести: по 100 мкл калибровочных образцов 0, 10 и 200 МЕ/мл;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов.

Инкубировать: 30 мин, 37°С.

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

Промыть: промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл конъюгата.

Инкубировать: 30 мин, 37°С.

Промыть: промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл раствора ТМБ.

Инкубировать: 25 мин, 18–25°С, в темноте.

Внести: по 100 мкл стоп-реагента.

Измерить: ОП на 450 нм / 620–655 нм.

Количественный анализ:

Внести: по 100 мкл калибровочных и контрольного образцов;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов.

Инкубировать: 30 мин, 37°С.

Промыть: промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл конъюгата.

Инкубировать: 30 мин, 37°С.

Промыть: промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл раствора ТМБ.

Инкубировать: 25 мин, 18–25°С, в темноте.

Внести: по 100 мкл стоп-реагента.

Измерить: 1) ОП на 450 нм / 620–655 нм

или

2) ОП на 405 нм / 620–655 нм.

7. Графические символы

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ n	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до ...		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 227-75-43.

---

* ГОСТ Р 51352-2013.

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

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистил. вода, мл		
1	2.0	до 50	1.0	1.0
2	4.0	до 100	2.0	2.0
3	6.0	до 150	3.0	3.0
4	8.0	до 200	4.0	4.0
5	10.0	до 250	5.0	5.0
6	12.0	до 300	6.0	6.0
7	14.0	до 350	7.0	7.0
8	16.0	до 400	8.0	8.0
9	18.0	до 450	9.0	9.0
10	20.0	до 500	10.0	10.0
11	22.0	до 550	11.0	11.0
12	24.0	до 600	12.0	12.0

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