

102

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 24.06. 2008 г. № ФСР 2008/02834

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного
количественного и качественного определения
иммуноглобулинов класса G к вирусу кори в сыворотке 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 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 в дубликатах 41 неизвестного, калибровочных образцов и 1 контрольного образца (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 IgG человека с пероксидазой хрена связывается с IgG к вирусу кори, иммобилизованными во время первой инкубации. Далее, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором НИИ СД Гришаевым, м.л. научным сотрудником НИИ СД О.В. Олейник.

107

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:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности рекомбинантным антигеном вируса кори, готовый для использования – 1 шт;
- 6 калибровочных образцов на основе инаktivированной сыворотки крови, содержащих 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 инаktivированной сыворотки крови человека с известным содержанием IgG к вирусу кори, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,5 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (12 мл);
- раствор для разведения конъюгата (PPK) – 1 флакон (12 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (25xФСБ-Т) – 1 флакон (40 мл) или 2 флакона (по 28 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент – 1 флакон (12 мл);
- плёнка для заклеивания планшета – 2 шт;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт;
- ванночка для реагента – 2 шт;
- наконечники для пипетки на 4 – 200 мкл – 16 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 «Вектор-Корь-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%.

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 ЗАО «Вектор-Бест» СОП № 05-2-204) – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности в лунках с положительными сыворотками $B_{9-16} \geq 1,2 \times B_{0,15}$;

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%: средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательными сыворотками $B_{1-8} \leq 0,8 \times B_{0,15}$.

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 набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

108
4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как в состав набора входят компоненты крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных 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.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двух-лучевом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 450 нм - 650 нм;

термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 1$ °C;

промывочное устройство для планшетов;

холодильник бытовой;

пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);

пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);

перчатки резиновые хирургические;

бумага фильтровальная лабораторная;

флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;

колба вместимостью 1000 мл;

вода дистиллированная;

6% раствор перекиси водорода.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре +2–8 °С не более 5 су-
ж или при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 6 мес.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифуги-
рованием при 5000-10000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (+18-25 °С).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворот-
ки крови следует выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 60 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анали-
за количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить
обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранить при температуре +2–8 °С в течение 1 мес.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора.

Готовится в мерном цилиндре.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество 25×ФСБ-Т и добавить соответст-
вующее количество дистиллированной воды.

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

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температу-
ре +30-40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре
+2-8 °С не более 3 сут.

7.4. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Внести во флакон необходимое количество раствора для разведения конъюгата и до-
бавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

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

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре не более 3 ч.

7.5. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

Внести во флакон необходимое количество СБР и добавить соответствующее количе-
ство концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

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

107

Рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре (+18-25 °C) не более 3 ч.

Таблица

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Рабочий промывочный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	РРК, мл	ТМБ, концентрат, мл	СБР, мл	25×ФСБ-Т, мл	Вода дистили- рованная, мл
1	0,1	1,0	0,07	1,0	2,0	48
2	0,2	2,0	0,14	2,0	4,0	96
3	0,3	3,0	0,21	3,0	6,0	144
4	0,4	4,0	0,28	4,0	8,0	192
5	0,5	5,0	0,35	5,0	10,0	240
6	0,6	6,0	0,42	6,0	12,0	288
7	0,7	7,0	0,49	7,0	14,0	336
8	0,8	8,0	0,56	8,0	16,0	384
9	0,9	9,0	0,63	9,0	18,0	432
10	1,0	10,0	0,70	10,0	20,0	480
11	1,10	11,0	0,77	11,0	22,0	528
12	1,20	12,0	0,84	12,0	24,0	576

7.6. Подготовка контрольных образцов

Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию и не требуют дополнительных разведений. Перед использованием встряхнуть.

7.7. Подготовка анализируемых образцов исследуемых сывороток крови

Сыворотки крови развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток: внести в лунки вспомогательного планшета по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл новой сыворотки, тщательно перемешать. При этом цвет раствора в лунках должен измениться с малинового на желтый. Если изменения цвета не произошло, результат анализа этой сыворотки может быть неправильным.

Хранить при комнатной температуре не более 3 ч.

7.8. Внесение калибровочных, контрольного образцов и исследуемых сывороток крови в лунки планшета для предварительного разведения

7.8.1. Внесение калибровочных и контрольного образцов

Количественное определение IgG к вирусу кори:

108
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.

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 МЕ/мл. Внести в одну лунку по 100 мкл РРС (контроль раствора ТМБ в СБР).

7.8.2. Внесение сывороток крови в предварительном разведении

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

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 5-7 мин.

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

7.10. По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором (6% раствор перекиси водорода) и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл рабочего промывочного раствора (см п. 7.3), с последующим отсасыванием через 30 с. Процесс промывки повторить. Общее число промывок равно 5. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла промывки. После промывки следует тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 7.4). Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37±1 °С.

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

7.12. По окончании второй инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором (6% раствор перекиси водорода) и промыть планшет 5 раз рабочим промывочным раствором так, как это указано в п. 7.10.

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензида (см. п. 7.5) и инкубировать в темноте в течение 25 мин при комнатной температуре (+18-25 °С).

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензида 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 рабочий раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента. При этом содержимое лунки окрашивается в желтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм; или при длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху).

Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Количественное определение IgG к вирусу кори.

9.1.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности для каждой лунки, 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.

9.1.2. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности для каждой лунки, содержащих исследуемые образцы сывороток крови, и определить в них содержание IgG к вирусу кори по калибровочному графику.

9.1.3. Исследуемый образец сыворотки крови считать отрицательным, если концентрация IgG к вирусу кори в нем менее или равна 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 сомнительным, 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. 7.7.), 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 лунки, содержащих калибровочные образцы.

Учёт результатов качественного определения проводить в том случае, если:

$$ОП_0 < 0,2;$$

$$ОП_{ТМБ} < 0,1.$$

где: $ОП_0$ - среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с калибровочным образцом 0 МЕ/мл, ед.опт. плотн.;

$ОП_{ТМБ}$ - значение оптической плотности в лунке контроля раствора ТМБ в СБР, ед.опт. плотн.;

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

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

Исследуемый образец сыворотки крови считать сомнительным, если его оптическая плотность находится в диапазоне $0,8 \times ОП_{0,15} \div 1,2 \times ОП_{0,15}$.

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. Набор реагентов ВектоКорь-IgG должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (9 мес).

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение не более 1 мес;

- концентрат промывочного раствора, субстратный буферный раствор и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

- калибровочные образцы, раствор для разведения сывороток, контрольный образец, концентраты конъюгата и тетраметилбензидина после вскрытия флаконов можно хранить в

плотно закрытых флаконах при температуре +2–8 °С не более 1 мес.

- рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре +2–8 °С не более 3 сут.
- предварительно разведенные сыворотки стандартной панели можно хранить при комнатной температуре + (18–25 °С) не более 3 ч.
- рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре не более 3 ч.
- рабочий раствор тетраметилбензидаина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре не более 3 ч.

10.3. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации IgG вируса кори в контрольной сыворотке.

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

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

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 336-60-60, тел./факс (383) 336-73-46, 336-60-30

в в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495) 120-60-95; 120-60-96.

Младший научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

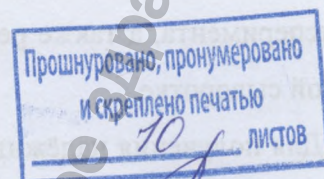
О.В. Олейник

Ректор ГОУ ВПО СГМУ
Росздрава

П.В. Глыбочко

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов



Информация получена с официального сайта

Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения

www.roszdravnadzor.ru