

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

29 2010 г.

М.П.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса G к человеческому герпес-вирусу 6 типа
в сыворотке (плазме) крови.
(ВектоННВ-6-IgG)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВектоННВ-6-IgG предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G (IgG) к человеческому герпес-вирусу 6 типа (ННВ-6) в сыворотке (плазме) крови.

1.2. Человеческий герпес-вирус 6 типа относится к подсемейству *Betaherpesvirinae*, роду *Roseolovirus*. Вирус ННВ-6 поражает следующие типы клеток: В- и Т-лимфоциты (более 90% инфицированных клеток), моноцитарные макрофаги, глиальные клетки и клетки тимуса. Диаметр вирионов вируса ННВ-6 составляет 140–200 нм.

1.3. Антитела к ННВ-6 обнаруживаются у 40–100% населения в зависимости от возраста, района проживания, социально-экологических условий.

ННВ-6 связывают с различными лимфопролиферативными иммуносупрессивными заболеваниями: ангиоиммунобластной лимфаденопатией; африканской лимфомой Беркитта; Т-клеточной острой лимфобластной лейкемией; лимфогранулематозом; инфекционным мононуклеозом, не связанным с вирусом Эпштейна-Барр; злокачественными новообразованиями и аутоиммунной патологией (синдром Леффрена, синдром Шегрена); некото-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором НИИ СД М.П. Гришаевым и с.н.с. лаборатории герпес-вирусных инфекций И.В. Аборневой

рыми заболеваниями ЦНС (HHV-6 идентифицирован в нейронах и глиальных клетках; в ядрах олигодендроцитов; в патологических образованиях, характерных для рассеянного склероза – у таких пациентов уровни антител более высокие, чем у здоровых лиц).

Доказана этиологическая роль HHV-6 в развитии внезапной экзантемы – заболевания детей в возрасте от 3-х месяцев до 3-х лет. Первичное инфицирование HHV-6 наиболее часто происходит в возрасте 3-6 месяцев, когда исчезают материнские антитела. Около половины всех случаев первой в жизни лихорадки новорожденных связано именно с первичным инфицированием HHV-6. Заболевание, как правило, заканчивается без осложнений, но описаны клинические случаи манифестной инфекции с различными симптомами, в том числе респираторные и гастроинтестинальные симптомы, неврологические осложнения (энцефалиты, менингоэнцефалиты, асептический менингит, судороги с последующей эпилепсией).

Первичная инфекция среди взрослых наблюдается редко, в основном в форме длительных лимфаденопатий, моноклеозоподобного синдрома, гепатита и т.д.

HHV-6 связывают также с синдромом хронической усталости, в отличие от внезапной экзантемы – болезни взрослых. Доказана этиологическая роль HHV-6 в возникновении данного синдрома, хотя до сих пор не ясно, связан ли синдром хронической усталости этиологически с инфицированием HHV-6, или же заболевание является следствием реактивации латентной инфекции.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа 92 неизвестных образцов, 4 контрольных образцов (всего 96 определений при использовании всего планшета), допускается 12 независимых постановок ИФА по 8 образцов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Специфическим реагентом набора является очищенный рекомбинантный белок HHV-6, иммобилизованный на поверхности лунок полистиролового планшета.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках планшета с иммобилизованным антигеном HHV-6. Антитела к вирусу связываются с иммобилизованным антигеном. Несвязавшийся материал удаляют отмывкой. Связавшиеся антитела выявляют при инкубации с конъюгатом антител к иммуноглобулинам класса G человека с пероксидазой хрена. После второй отмывки количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-волна

в диапазоне 620–655 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации содержащихся в исследуемом образце антител к HHV-6.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок рекомбинантным антигеном HHV-6, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgG к HHV-6, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к HHV-6, готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,5 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата (РПК) – 1 флакон (13,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 флакона (по 28,0 мл);
- раствор тетраметилбензидина (ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками 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. Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G к HHV-6 – соответствие результатов определения набором IgG к HHV-6 требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-102), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» - составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с положительными сыворотками №8-№15 больше либо равны величине критического зна-

чения оптической плотности ($ОП_{№8-№15} \geq ОП_{крит}$).

3.2. Специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к HNV-6 – соответствие результатов определения набором IgG к HNV-6 требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-102), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» - составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с отрицательными сыворотками №1-№7 меньше либо равны величине критического значения оптической плотности, умноженного на 0,8 ($ОП_{№1-№7} \leq 0,8 \times ОП_{крит}$).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2a (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.).

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.

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 при длине волны 450 нм;

- термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °С;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 10 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 10 мкл до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования;
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности 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 °С не более 5 суток или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 6 мес. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови. После размораживания образцы тщательно перемешать.

6.3. Образцы сыворотки (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 в течение времени не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 3 мес.

7.3. Приготовление рабочего 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 реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного и отрицательного контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию. Перед использованием встряхнуть.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 3 мес.

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 этом темно-красный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, ИФА данного образца может дать неправильный результат.

Предварительно разведенные исследуемые образцы можно хранить при температуре от 18 до 25 °C не более 3 ч.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Готовится в стеклянном флаконе или в пластиковой ванночке для реагента из концентрата конъюгата и РРК не более, чем за 5-10 мин до окончания первой инкубации.

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25 °C не более 3 ч.

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

7.7. Подготовка раствора ТМБ.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента не более, чем за 5-10 мин до окончания второй инкубации и поместить в защищенное от света место.

Раствор ТМБ можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

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

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

Таблица

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Раствор Тетраметилбензидаина, мл	Рабочий промывочный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл		25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Вода дистиллированная, мл
1	0,1	1,0	1,0	2,0	до 50
2	0,2	2,0	2,0	4,0	до 100
3	0,3	3,0	3,0	6,0	до 150
4	0,4	4,0	4,0	8,0	до 200
5	0,5	5,0	5,0	10,0	до 250
6	0,6	6,0	6,0	12,0	до 300
7	0,7	7,0	7,0	14,0	до 350
8	0,8	8,0	8,0	16,0	до 400
9	0,9	9,0	9,0	18,0	до 450
10	1,0	10,0	10,0	20,0	до 500
11	1,1	11,0	11,0	22,0	до 550
12	1,2	12,0	12,0	24,0	до 600

7.9. Внесение контрольных образцов и исследуемых сывороток

В лунку А-1 внести 100 мкл раствора для разведения сывороток (РРС). Лунка А-1 будет являться контролем поглощения раствора тетраметилбензидаина (ТМБ).

Внести в одну лунку 100 мкл положительного контрольного образца (K^+) и в две лунки по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-).

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл пред-

варительно разведенных исследуемых сывороток (п. 7.5), тщательно перемешать. Раствор для разведения сывороток перед употреблением встряхнуть!

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

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

7.11. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть с помощью промывочного устройства или многоканальной пипетки, добавляя во все лунки по 400 мкл рабочего промывочного раствора (см п. 7.3) в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Общее число промывок равно 5. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмытки. Раствор из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.12. Внести в лунку А-1 100 мкл раствора для разведения конъюгата (РРК). В остальные лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.6).

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

Оставшийся после проведения ИФА рабочий раствор конъюгата удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором.

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

7.14. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет, как указано в п. 7.11.

7.15. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ (см п. 7.7).

Для внесения раствора ТМБ использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

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

Оставшийся после проведения ИФА раствор ТМБ удалить из стеклянного флакона или пластиковой ванночки в сосуд с дезинфицирующим раствором.

7.16. 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: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 655 нм; допускается измерение 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 РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{\phi K^-}$).

9.2. Значение оптической плотности в лунке с РРС не должно превышать 0,10 ед. опт. пл.

Среднее значение ОП в лунках с K^- не должно превышать 0,20 ед. опт. пл. при использовании двухволнового режима измерения и не превышать 0,25 ед. опт. пл. при измерении на одной длине волны.

Значение ОП в лунке с K^+ должно быть не менее, чем 0,80 ед. опт. пл.

9.3. Только при соблюдении положений п. 9.2 можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.4. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит.}$).

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср. K^-} + 0,2$$

9.5. Результат анализа считается положительным, если $ОП_{обр.} \geq ОП_{крит.}$

Результат анализа считается отрицательным, если $ОП_{обр.} \leq 0,8 \times ОП_{крит.}$

где: $ОП_{обр.}$ – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом сыворотки крови.

Результат анализа считается сомнительным, если $0,8 \times ОП_{крит.} < ОП_{обр.} < ОП_{крит.}$. Рекомендуются повторно провести иммуноферментный анализ данного образца.

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. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (9 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение 3 мес. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес;
- положительный и отрицательный контрольные образцы можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор тетраметилбензидина, раствор для предварительного 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;
- концентрат конъюгата, раствор для разведения конъюгата и раствор для разведения сывороток после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес;
- рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток;
- рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25°С не более 3 ч;

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

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), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

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

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 336-73-46, 227-75-43, тел./факс (383) 336-60-30,
и в Лабораторный центр ФГУ «НЦ ЭСМП» по адресу:
117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495) 120-60-95; 120-60-96.

Старший научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

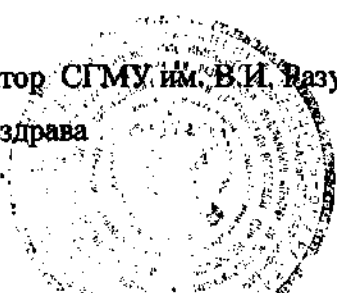
Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

Ректор СГМУ им. В.И. Вазумовского
Росздрава
м.п.

И.В. Аборнева

М.П. Гришаев

В.М. Попков





Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
123076 листов

П. Терришвили Е.А.