

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусайнов

2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса G к капсидному антигену VCA
вируса Эпштейна-Барр в сыворотке (плазме) крови
(ВектоВЭБ-VCA-IgG)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВектоВЭБ-VCA-IgG предназначен для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к капсидному антигену VCA вируса Эпштейна-Барр в сыворотке (плазме) крови.

1.2. Вирус герпеса человека 4 типа (ВГЧ-4) или вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) относится к подсемейству *Gammaherpesvirinae* рода *Gymphocryptovirus*. ВЭБ поражает в основном два типа клеток: эпителий верхних дыхательных путей и пищеварительного тракта, а также В-лимфоциты, которые в результате инфицирования immortalizуются. Соответственно, ВЭБ вызывает такие различные заболевания, как инфекционный мононуклеоз, злокачественная лимфома Беркитта, злокачественная носоглоточная карцинома.

1.3. Заболевание малоконтагиозно вследствие наличия большого числа иммунокомпетентных лиц (до 50% детей и 95% взрослых серопозитивны в отношении ВЭБ) и протекания болезни в стертых и атипичных формах.

У иммунокомпетентных лиц первичное инфицирование ВЭБ может протекать бессимптомно или вызывать субклинические проявления болезни с положительными серологиче-

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

скими реакциями. В дальнейшем вирус может длительное время персистировать в клетках хозяина в виде латентной инфекции. При массивном поступлении вируса или недостаточности иммунной системы развивается вирусемия, приводящая к острым формам заболевания. Показана возможность трансфузионной передачи ВЭБ от доноров с острой фазой первичной инфекции.

В процессе репликации вируса экспрессируется свыше 70 различных вирусоспецифических белков, однако, к настоящему времени выделены группы иммуногенных белков, опосредование антител к которым дает возможность дифференцировать стадию инфекции. Наиболее специфичными и чувствительными маркерами ВЭБ-инфекции являются IgG и IgM к капсидному антигену (VCA), IgG к раннему антигену (EA) и IgG к ядерному антигену (NA).

1.4. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные образцы, допускается 12 независимых постановок ИФА по 8 образцов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения IgG к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Специфическим реагентом набора являются очищенные рекомбинантные капсидные белки VCA вируса Эпштейна-Барр, иммобилизованные на поверхности лунок полистиролового планшета.

На первой стадии анализа исследуемые образцы инкубируют в лунках планшета с иммобилизованными антигенами вируса Эпштейна-Барр. Антитела к вирусу связываются с иммобилизованными антигенами. Несвязавшийся материал удаляют отмывкой. Связавшиеся антитела выявляют посредством инкубации с конъюгатом антител к IgG человека с пероксидазой хрена. Комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. После добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–650 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации содержащихся в исследуемом образце антител к капсидным антигенам вируса Эпштейна-Барр.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок рекомбинантными антигенами VCA ВЭБ, готовый для использования – 1 шт.;

– положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgG к VCA ВЭБ, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);

– отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к VCA ВЭБ, 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 (PPC) – 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);

– субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);

– тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1 флакон (1,0 мл);

– стоп-реагент – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

– пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;

– ванночками для реагентов – 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 VCA ВЭБ по стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-261), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%.

3.2. Специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к VCA ВЭБ по стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-261), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (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 пораженный участок

большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

работать в резиновых перчатках;

не пипетировать растворы ртом;

все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113 от 29.10.98.

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 °C;

– 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, позво-

ляющие отбирать объёмы жидкостей от 10 мкл до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пинетирования;

- 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 °C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (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 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °C 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 °С 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 °С 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 красный цвет должен измениться на жёлтый. Если изменения цвета не произошло, ИФА данного образца может дать неправильный результат.

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

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Готовится в стеклянном флаконе или в пластиковой ванночке для реагентов из концентрата конъюгата и РРК.

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

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

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

Готовится в стеклянном флаконе или в пластиковой ванночке для реагентов из концентрата ТМБ и СБР.

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

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

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

7.9. Внесение контрольных образцов и исследуемых сывороток

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 предварительно 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.

Таблица

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Рабочий промывочный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	Концентрат тетраме- тил- бензидина, мл	Субстрат- ный бу- ферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно- солевого бу- ферного рас- твора с тви- ном, мл	Вода дис- тиллирован- ная, мл
1	0,1	1,0	0,05	1,0	2,0	до 50
2	0,2	2,0	0,10	2,0	4,0	до 100
3	0,3	3,0	0,15	3,0	6,0	до 150
4	0,4	4,0	0,20	4,0	8,0	до 200
5	0,5	5,0	0,25	5,0	10,0	до 250
6	0,6	6,0	0,30	6,0	12,0	до 300
7	0,7	7,0	0,35	7,0	14,0	до 350
8	0,8	8,0	0,40	8,0	16,0	до 400
9	0,9	9,0	0,45	9,0	18,0	до 450
10	1,0	10,0	0,50	10,0	20,0	до 500
11	1,1	11,0	0,55	11,0	22,0	до 550
12	1,2	12,0	0,60	12,0	24,0	до 600

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 отмывки. Раствор из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.12. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.6).

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

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

7.13. Планшет заклеить плёнкой 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 рабочего раствора ТМБ (см п. 7.7).

Для внесения раствора ТМБ использовать ванночку для реагентов 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 рабочий раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 5 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

9.2. Среднее значение ОП в лунках с K^- не должно превышать 0,25 ед. опт. пл.

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 ($ОП_{\text{крит.}}$).

$$ОП_{\text{крит.}} = ОП_{\text{ср.}} K^+ + 0,1$$

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

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

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

Результат анализа считается сомнительным, если $0,8 \times ОП_{крит.} \leq ОП_{обр.} \leq ОП_{крит.}$. Рекомендуется 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 для предварительного разведения сывороток, субстратный буферный раствор 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, концентрат тетраметилбензидина, 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;

- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте 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, СБР, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Doc

Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

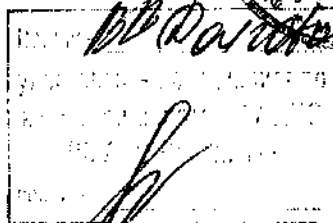
М.П. Гришаев

зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики

ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор В.В. Долгов

ЗД» Ленин 20 // г.





Проинформировано, проинформировано
и скреплено печатью
10 листов

А. (Сиринский 2А.)