

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«24» 103 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
индекса авидности иммуноглобулинов класса G к вирусу
Западного Нила в сыворотке (плазме) крови
(ВектоНил-IgG-авидность)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВектоНил-IgG-авидность предназначен для иммуноферментного определения индекса авидности иммуноглобулинов класса G к вирусу Западного Нила (ВЗН) в сыворотке (плазме) крови.

1.2. Определение индекса авидности иммуноглобулинов класса G к вирусу Западного Нила (ВЗН) может быть использовано в клинике для постановки и подтверждения диагноза лихорадки Западного Нила.

1.3. Лабораторная диагностика инфекции, вызванной ВЗН, включает определение IgM и IgG в сыворотке крови или (и) цереброспинальной жидкости. Антитела к ВЗН обнаруживаются уже в первый-второй день после проявления заболевания. В течение первой недели болезни кумулятивный процент серопозитивных пациентов (IgM+IgG) растет приблизительно на 10% каждый день. Особенностью иммунного ответа к ВЗН является длительная циркуляция специфических IgM. Приблизительно 50% людей с острой инфекцией центральной нервной системы, вызванной ВЗН, имеют персистирующие IgM на протяжении более 8 месяцев, а около 40% – более 16 месяцев. Поэтому присутствие в сыворотке IgM к ВЗН не обя-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.П. Гришаевым и ведущим научным сотрудником лаборатории герпес-вирусных инфекций О.А. Шваревой

зательно является доказательством острой фазы инфекции, а свидетельствуют только о первичном инфицировании в пределах предыдущих 16 месяцев.

Измерение авидности IgG к вирусу Западного Нила позволяет определить период времени, прошедший после первичного инфицирования. Так IgG, нарабатанные в первые 2–3 месяца после первичного инфицирования, имеют низкую авидность, в то время как IgG в более поздние сроки показывают высокую авидность.

Таким образом, наличие IgM и низкоавидных IgG свидетельствует об острой, либо недавно перенесенной инфекции, обусловленной ВЗН.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа 48 исследуемых образцов, включая контроли, допускается 6 независимых постановок ИФА по 8 образцов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Специфическим реагентом набора является очищенный антиген вируса Западного Нила, сорбированный на поверхности лунок полистиролового разборного планшета.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках параллельных рядов с иммобилизованным антигеном. Имеющиеся в сыворотке антитела к ВЗН связываются с иммобилизованным антигеном, формируя комплекс «антиген–антитело». На второй стадии, после внесения белок-диссоциирующего агента в один из параллельных рядов, происходит диссоциация комплексов «антиген–антитело», включающих IgG с более низкими константами связывания (низкой авидностью). На третьей стадии связавшиеся антитела взаимодействуют с конъюгатом антител против IgG человека с пероксидазой хрена. Комплекс «антиген–антитело–конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству связанных в комплекс IgG к ВЗН в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антигеном ВЗН, готовый для использования – 1 шт.;
- высокоавидный положительный контрольный образец (K^+_{BA}) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащий высокоавидные IgG к ВЗН, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);

– низкоавидный положительный контрольный образец (K^+_{HA}) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащий низкоавидные IgG к ВЗН; готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);

– отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к ВЗН, готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);

– конъюгат – моноклональные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);

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

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

– раствор белок-диссоциирующего агента (БДА) – 1 флакон (6 мл);

– раствор сравнения (РС) – 1 флакон (6 мл);

– раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

– пленками для заклеивания планшета – 3 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.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления высокоавидных IgG к ВЗН по сывороткам стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-232), не содержащей и содержащей иммуноглобулины класса G к ВЗН с разным индексом авидности, % – 100.

3.2. Специфичность выявления низкоавидных IgG к ВЗН по сывороткам стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-232), не содержащей и содержащей иммуноглобулины класса G к ВЗН с разным индексом авидности, % – 100.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок

большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113-00.

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 приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

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

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ C$;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл (погрешность не более 5%);
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;

- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. 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.

6.2. 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 в течение всего срока годности.

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 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 в течение всего срока годности.

7.5. Предварительное разведение исследуемых образцов.

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

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

7.6. Приготовление конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента не более, чем за 5-10 мин до окончания второй инкубации.

Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

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

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

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 третьей инкубации и поместить в защищенное от света место.

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

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

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

7.8. Стоп-реагент, РС и БДА готовы к использованию.

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

7.9. Внесение контрольных образцов и исследуемых сывороток

В лунки стрипов внести попарно по 100 мкл контрольных образцов для прямого (нечетные стрипы) и диссоциирующего (четные стрипы) ИФА. Например, в лунки А-1, А-2 и В-1, В-2 – K^- , в лунки С-1, С-2 – K^+_{HA} , в лунки D-1, D-2 – K^+_{BA} .

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток, затем попарно в соседние лунки двух стрипов внести по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток (п. 7.5), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке получается разбавленной в 100 раз.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение 10-15 мин.

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

7.11. По окончании инкубации снять липкую пленку и 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 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 2. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмытки.

7.12. Внесение РС и БДА

Во все лунки нечетных стрипов (для прямого ИФА) внести по 100 мкл раствора сравнения. Во все лунки четных стрипов (для диссоциирующего ИФА) внести по 100 мкл белок-диссоциирующего агента.

7.13. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 15 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7.14. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет (как указано в п. 7.11) 3 раза.

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

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

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

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

7.17. По окончании третьей инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет (как указано в п. 7.11) 5 раз.

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

Для внесения раствора ТМБ использовать ванночку для реагентов и одноразовые накопечники.

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

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

7.19. 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 в прямом ИФА ($ОП_{ср} K^-_{прям}$ ИФА).

Рассчитать индекс avidности (ИА) (процент снижения сигнала в диссоциирующем ИФА) для положительных контрольных образцов, используя значения ОП в прямом ИФА ($ОП K^+_{прям}$ ИФА) и в диссоциирующем ИФА ($ОП K^+_{диссоц}$ ИФА), по следующей формуле:

$$ИА K^+ = \frac{ОП K^+_{диссоц} ИФА}{ОП K^+_{прям} ИФА} \times 100\% \quad (1)$$

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

Среднее значение ОП в лунках с K^- в прямом ИФА не должно превышать 0,25 ед. опт. пл.; значение ОП в лунках с положительными контрольными образцами в прямом ИФА $K^+_{ВА}$ и $K^+_{НА}$ должно быть не менее 0,70 ед. опт. пл.

значение индекса avidности $K^+_{ВА}$ должно быть более 70%;

значение индекса avidности $K^+_{НА}$ должно быть менее 50%.

9.2. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит.}$) в прямом ИФА.

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср.} \cdot K_{прям.} \cdot ИФА + 0,2 \quad (2)$$

Если $ОП_{иссл.} > ОП_{крит.}$, то результат анализа исследуемого образца считать положительным. Присутствие IgG к вирусу Западного Нила отражает наличие текущей или перенесенной ранее инфекции.

Если ОП сыворотки в прямом ИФА превышает $ОП_{крит.}$, вычислить индекс avidности исследуемого образца по формуле 3.

$$ИА_{обр} = \frac{ОП_{обр_{диссоц.}} \cdot ИФА}{ОП_{обр_{прям.}} \cdot ИФА} \times 100\% \quad (3)$$

9.3. Значение $ИА < 50\%$ указывает на наличие низкоавидных антител;

значение $ИА > 70\%$ указывает на наличие высокоавидных антител;

значение ИА в интервале 50–70 % – пограничный результат.

9.4. Если ОП исследуемой сыворотки выше 3 о.е., возможна ошибка в определении ИА, а именно, его завышение.

С целью правильного определения индекса avidности специфических иммуноглобулинов в таких сыворотках (особенно при наличии в сыворотке специфических IgM) необходимо предварительно развести исходную сыворотку в 4 раза, используя в качестве разводящего раствора рабочий промывочный раствор (п. 7.3), и повторить тест на avidность в соответствии с Инструкцией.

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 всего срока годности. В случае дробного использования набора:

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

- положительный и отрицательный контрольные образцы можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для предварительного разведения сывороток и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно

0