

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ОАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

_____ 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса М к вирусу Западного Нила в сыворотке (плазме) крови
(ВектоНил-IgM)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВектоНил-IgM» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу Западного Нила (ВЗН) в сыворотке (плазме) крови человека методом «захвата», и может быть использован для диагностики первичного инфицирования ВЗН.

1.2. Лабораторная диагностика инфекции, вызванной ВЗН, включает определение иммуноглобулинов класса М и G (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 вирусом Западного Нила, имеют персистирующие IgM на протяжении более 8 месяцев, а около 40% – более 16 месяцев. Поэтому присутствие в сыворотке IgM к ВЗН не обязательно 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, продуцируемые в первые 2-3 месяца после первичного инфицирования, имеют низкую авидность, в то время как IgG в более поздние сроки показывают высокую авидность.

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

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

Использование наборов для определения IgM, основанных на методе «захвата» (capture-вариант), позволяет избежать ложноположительных результатов, связанных с присутствием в испытуемом образце ревматоидного фактора класса М, тем самым повышая специфичность определения.

1.3. 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

Специфическими компонентами набора являются моноклональные антитела к IgM человека, иммобилизованные в лунках планшета, очищенный антиген ВЗН, конъюгат – моноклональные антитела к ВЗН, конъюгированные с пероксидазой хрена, положительный и отрицательный контрольные образцы.

В лунках планшета при добавлении исследуемого образца во время первой инкубации происходит связывание иммуноглобулинов класса М с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к IgM человека.

Во время второй инкубации связавшиеся IgM к ВЗН взаимодействуют с добавленным в лунки антигеном ВЗН и конъюгатом моноклональных антител к ВЗН с пероксидазой хрена.

Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgM к ВЗН в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к IgM человека, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgM к ВЗН, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgM к ВЗН, готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);
- антиген ВЗН, инактивированный – 1 флакон (1,5 мл);
- конъюгат – моноклональные антитела к ВЗН, конъюгированные с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (12 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);
- раствор тетраметилбензидаина (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 – 2 шт.;
- ванночками для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки 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 иммуноглобулинов класса М к ВЗН – соответствие результатов определения набором IgM к ВЗН требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-447), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%.

3.2. Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса М к ВЗН – соответствие результатов определения набором IgM к ВЗН требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-447), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%.

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 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 клинко-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 потенциаль-

но 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 $8^\circ C$ не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус $20^\circ C$ (и ниже) не более 6 мес.

Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может при-

вести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.2. Образцы сывороток (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 не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета.

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

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

7.3. Приготовление 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 °С до полного растворения осадка.

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

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

7.4. Подготовка положительного и отрицательного контрольных образцов.

Положительный и отрицательный контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

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

7.5. Предварительное разведение исследуемых образцов.

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

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

7.6. Приготовление смеси конъюгата и антигена ВЗН.

В соответствии с числом используемых стрипов в отдельный чистый флакон или в

пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество конъюгата и антигена ВЗН, тщательно перемешать.

Смесь конъюгата и антигена ВЗН 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. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента и поместить в защищенное от света место.

Оставшийся после проведения ИФА раствор тетраметилбензидина утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).

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

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

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

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

Таблица

Количество используемых стрипов	Смесь конъюгата и антигена ВЗН		Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
	Конъюгат, мл	Антиген ВЗН, мл		ФСБ-Т×25 концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл
1	1,0	0,1	1,0	2,0	до 50
2	2,0	0,2	2,0	4,0	до 100
3	3,0	0,3	3,0	6,0	до 150
4	4,0	0,4	4,0	8,0	до 200
5	5,0	0,5	5,0	10,0	до 250
6	6,0	0,6	6,0	12,0	до 300
7	7,0	0,7	7,0	14,0	до 350
8	8,0	0,8	8,0	16,0	до 400
9	9,0	0,9	9,0	18,0	до 450
10	10,0	1,0	10,0	20,0	до 500
11	11,0	1,1	11,0	22,0	до 550
12	12,0	1,2	12,0	24,0	до 600

7.9. В лунку А-1 внести 100 мкл положительного контрольного образца (K^+).

В лунки В-1, С-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-).

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток (PPC) и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови (см п. 7.5), перемешать пипетированием. Раствор для разведения сывороток перед употреблением встряхнуть!

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 60 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.10. 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 (см 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.*

7.11. Внести во все лунки планшета по 100 мкл смеси конъюгата и антигена ВЗН (см п. 7.6).

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

7.12. Планшет заклеить пленкой и выдержать в термостате в течение 90 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.13. По окончании инкубации промыть планшет как описано в п. 7.10.

7.14. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ.

Планшет выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 $^\circ\text{C}$.

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

7.15. 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: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620-655 нм. Допускается измерение оптической плотности при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху).

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

9.2. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср. K^-} + 0,2$$

где: $ОП_{ср. K^-}$ – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.3. Оценка результатов:

– среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,25 ед. опт. плотн.;

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 1,00 ед. опт. плотн.

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

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

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

где: $ОП_{обр}$ – оптическая плотность в лунке с исследуемым образцом.

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

10. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие IgM к вирусу Западного Нила отражает наличие первичной инфекции. При этом необходимо проведение повторного анализа таких сывороток для исключения ложноположительных результатов, обусловленных случайными, несистемными ошибками при постановке анализа.

Отсутствие специфических IgM не означает, что пациент не инфицирован ВЗН. Если кровь взята у больного в начале острой фазы заболевания, IgM в сыворотке крови могут отсутствовать, поэтому при подозрении на наличие инфекции (клинические проявления) рекомендуется исследовать сыворотку, взятую у пациента через 5-10 дней, на наличие IgM повторно.

Если результат анализа неопределенный, то рекомендуется повторить анализ такой сыворотки. При повторном неопределенном результате необходимо проанализировать сыворотку, полученную через 5-10 дней, параллельно с 1-м образцом сыворотки, на наличие IgM и IgG для выявления сероконверсии и подтверждения факта инфицирования ВЗН.

Для постановки окончательного диагноза рекомендуется исследование сыворотки, взятой на ранних стадиях заболевания, на наличие специфических иммуноглобулинов класса G и определения их индекса авидности. Совокупность результатов ИФА, клиники и эпидемиологии инфекции позволяет ставить окончательный диагноз лихорадки Западного Нила.

При анализе парных сывороток для контроля изменения концентрации IgM или наличия сероконверсии оба образца должны быть тестированы одновременно во время одной постановки.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации IgM к ВЗН в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1. 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.

11.2. 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.

11.3. 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, конъюгат, антиген ВЗН и раствор ТМБ после вскрытия флаконов 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, раствор для 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;

- смесь конъюгата и антигена ВЗН можно хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч;

- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

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

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

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

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 363-20-60, 363-57-95, тел./факс (383) 363-13-46, 363-35-55.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Ведущий научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



О.А. Шварева

Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.П. Гришаев

Начальник управления по науке,
инновациям и информатизации
ГБОУ ВПО НГМУ
Минздравсоцразвития России



М.Ф. Осипенко

