

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления

иммуноглобулинов класса G к вирусу

Западного Нила в сыворотке (плазме) крови

(ВектоНил-IgG)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВектоНил-IgG» (далее по тексту – набор) предназначен для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу Западного Нила (ВЗН) в сыворотке (плазме) крови.

1.2. Выявление иммуноглобулинов класса G к вирусу Западного Нила может быть использовано с целью диагностики лихорадки Западного Нила в клинических и эпидемиологических исследованиях.

1.3. Одной из важных особенностей семейства Flaviviridae, к которому относится вирус ЛЗН, является наличие выраженных антигенных перекрестов между его представителями, в том числе между вирусами серокомплекса клещевого энцефалита и вирусами, передаваемыми москитами. IgG к вирусу ЗН могут иметь достаточно широкий спектр перекрестной реактивности с другими флавивирусами (вирусы клещевого энцефалита, японского энцефалита, Омской геморрагической лихорадки, Повассан, Лангат). Такой перекрест отмечается в образцах с высоким титром антител. В связи с этим при интерпретации результатов необходимо учитывать не только лабораторные, ни и клинические и эпидемиологические данные.

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

40

1.4. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли; допускается 12 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.

При инкубации в лунках исследуемых образцов происходит связывание антител к ВЗН с иммобилизованным антигеном. Связавшиеся антитела выявляют с помощью конъюгата моноклональных антител против IgG человека с пероксидазой хрена. Количество связавшегося конъюгата определяют 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 620–655 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации специфических IgG к ВЗН в анализируемом образце сыворотки (плазмы) крови.

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.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащий 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 вирусу 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 (PPC) – 1 флакон (12 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 IgG к ВЗН по сывороткам стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-232), не содержащей иммуноглобулины класса G к ВЗН – составляет 100 %.

3.2. Чувствительность выявления IgG к ВЗН по сывороткам стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-232), содержащей иммуноглобулины класса G к ВЗН – 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 клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» от 30.12.1998 г).

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 оказы-

вающие 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 объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100; 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 °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 °С 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 °С 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 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 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.

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.

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.

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.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента 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.

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

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

Таблица

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

7.9. В лунку А-1, В-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-).

В лунки С-1 внести 100 мкл положительного 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, перемешать пипетированием. *Раствор для разведения сывороток перед употреблением встряхнуть!*

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 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. Содержимое лунок удалить отсасыванием 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.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

Планшет заклеить пленкой и выдержать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

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

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

7.13. 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.

7.14. 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.

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 ($\text{ОП}_{\text{ср. К}^-}$).

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

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср. К}^-} + 0,2$$

где: $\text{ОП}_{\text{ср. К}^-}$ — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.3. Оценка результатов:

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 1,0 ед. опт. плотн.

– среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,25 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 $ОП_{обр.} \leq 0,8 \times ОП_{крит.}$

Результат анализа считать неопределенным, если соответствующее ему значение $ОП_{обр}$ попадает в интервал от $0,8 \times ОП_{крит.}$ до $ОП_{крит.}$. Рекомендуется повторить анализ такой сыворотки. При повторном неопределенном результате необходимо проанализировать сыворотку, полученную через 10–15 дней, параллельно с 1-м образцом сыворотки, чтобы проследить увеличение концентрации IgG.

10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ В ВЫЯВЛЕННЫХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

10.1. Если необходимо определить титр антител в выявленных положительных образцах, непосредственно перед основной реакцией проводят титрование исследуемых сывороток следующим образом:

В лунки А-1 и В-1 внести по 100 мкл K^- , в лунку С-1 – 100 мкл K^+ . В остальные лунки верхнего ряда А-2 – А-12 внести по 180 мкл РРС и по 20 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток, перемешать пипетированием. Во все оставшиеся лунки внести по 100 мкл РРС.

Многоканальной пипеткой перенести по 100 мкл разведенных сывороток из лунок верхнего ряда в лунки 2-го ряда, перемешать (контрольные образцы не титровать). Из лунок 2-го ряда – в лунки 3-го ряда, перемешать. Так же последовательно переносить до последнего ряда. Из последнего ряда сбросить по 100 мкл содержимого лунок. Таким образом, в вертикальных рядах получают последовательные 2 кратные разведения исследуемых сывороток.

10.2. Планшет закрыть и инкубировать при температуре 37°C в течение 30 мин.

10.3. Дальнейший ход анализа аналогичен вышеописанному для выявления положительных сывороток.

Результаты анализа оценивают аналогично вышеописанному.

10.4. Титром считают последнее разведение исследуемой сыворотки, при котором ОП в соответствующей лунке на 0,2 единицы превышает $ОП_{ср. K^-}$.

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 3 мес. 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 хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- конъюгат, раствор тетраметилбензидина, раствор для разведения сывороток после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

11.4. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

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

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383)
336-73-46, 363-57-95, тел./факс (383) 336-60-30.

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

Зам. директора по научной работе Московского
Областного Научно-исследовательского
Клинического Института им. М.Ф. Владимирского
(МОНИКИ)



В.И. Шумский

