

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20 ____ г.

№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»

И.О. Генерального директора

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»



В.Н.Михеев

«____» _____ 20 15 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола
«Вектор ИФА Эбола-АТ скрин»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» предназначен для совместного и отдельного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола в сыворотке и плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА). Рекомендуется для клинической лабораторной диагностики болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ), и проверки эффективности вакцинации против вируса Эбола.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика. Диагностические исследования проводят в изолированных лабораториях в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Допускается проведение диагностических исследований (без накопления возбудителя вирусологическими методами) в лабораториях специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора.

ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ, УЧАСТВУЮЩЕМУ В ВЫПОЛНЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончившие соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп патогенности, не имеющие противопоказаний к применению средств профилактики и лечения и к работе в средствах индивидуальной защиты.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

«Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» представляет собой набор реагентов, основой которого является разборный полистироловый планшет, в лунках которого сорбирован антиген вируса Эбола. Основным свойством набора является способность выявлять в сыворотках (плазме) крови человека IgG и IgM (совместно и отдельно), специфические к белкам вируса Эбола. На первой стадии инкубации происходит взаимодействие специфических антител (при их наличии в исследуемом образце) с сорбированными на поверхности лунок планшета антигенами.

На второй стадии инкубации образовавшиеся комплексы «антиген-антитело» выявляют с помощью одного из конъюгатов (анти-IgM, анти-IgG) или одновременно двух иммуноферментных конъюгатов в зависимости от целей анализа. Визуализация результата происходит при добавлении к комплексам «антиген-антитело-конъюгат» рабочего раствора хромогена. При этом развивается окрашивание раствора, интенсивность окрашивания прямо зависит от количества выявленных комплексов. Для остановки реакции в лунки с рабочим раствором хромогена добавляют стоп-реагент. Затем учитывают результат анализа с помощью планшетного ридера.

контрольных образцов.

При исследовании небольшого количества образцов возможно проведение 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов в каждой, включая контрольные образцы.

Набор комплектуется всеми необходимыми реагентами, кроме воды очищенной.

2.2. Состав набора

Наименование компонента	Количество (объем)
Иммуносорбент - планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном вируса Эбола	1 шт.
К+ контрольный положительный образец на основе инаktivированной сыворотки крови, содержащей IgG и IgM к вирусу Эбола в количестве, показывающем положительный результат при титровании не менее чем 1:100 - прозрачная красного цвета жидкость	1 фл. (1,5 мл)
К- контрольный отрицательный образец на основе инаktivированной сыворотки крови, не содержащей антител к вирусу Эбола - прозрачная желтого цвета жидкость	1 фл. (2,5 мл)
Кг анти-IgM: 20х концентрат моноклональных мышинных антител к IgM человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, для диагностики острой стадии инфекции - прозрачная синего цвета жидкость	1 фл. (0,7 мл)
Кг анти-IgG: 20х концентрат моноклональных мышинных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, для диагностики реконвалесценции и протективной защиты после вакцинации - прозрачная зеленого цвета жидкость	1 фл. (0,7 мл)
РБР-С буферный раствор для разведения сывороток - прозрачная синего цвета жидкость	1 фл. (11,0 мл)
РБР-К буферный раствор для разведения конъюгата - прозрачная зеленого цвета жидкость	1 фл. (13,0 мл)
ТМБ 20х концентрат хромогена тетраметилбензидин - прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость	1 фл. (0,7 мл)
БРС цитрат-фосфатный раствор с перекисью водорода для разведения ТМБ - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13,0 мл)
ФСБ-Т (концентрат x25) 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином - прозрачная, слегка опалесцирующая, бесцветная жидкость, допускается выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при нагревании при температуре 37 °C в течение 30 мин	1 фл. (26,0 мл)
стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (6,0 мл)
пленка для заклеивания планшета	3 шт.
ванночка для реагентов	3 шт.
наконечники для пипетки на 4-200 мкл	16 шт.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Нижний порог обнаружения аналита. Набор реагентов должен выявлять антитела классов G и M к вирусу Эбола в контрольных образцах № 1 - № 4 рабочей панели образцов предприятия «РП АТ(+/-)Эбола». При титровании не менее чем до 1:10 положительный образец № 1 «РП АТ(+/-)Эбола» или аналогичный по содержанию антител должен показывать положительный результат.

3.2. Специфичность. Антитела классов G и M к вирусу Эбола не должны выявляться в контрольных образцах №5-№8 РП АТ(+/-)Эбола».

3.3. Воспроизводимость. Установлена исследованием коэффициента вариации оптических плотностей (ОП) одного и того же положительного образца. Коэффициент вариации не более 10 %.

Результаты клинической апробации набора реагентов «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» приведены в приложении к инструкции по применению.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. В соответствии с классификацией патогенных для человека микроорганизмов вирус Эбола относится к I группе патогенности (СП 1.3.3118-13).

4.2. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ Минздрава России от 6 июня 2012 г. № 4 н).

4.3. При работе с набором соблюдать требования СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Утв. МЗ СССР 17 января 1991 г.) и ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Все реагенты набора, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Серная кислота, входящая в состав стоп-реагента, обладает раздражающим действием. При попадании стоп-реагента на кожу и слизистые, промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. Работа с исследуемыми и контрольными образцами проводится в помещениях с уровнем безопасности BSL-3.

4.6. Все использованные материалы, инструменты и оборудование, рабочее место дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

4.7. Утилизация наборов реагентов с истекшим сроком годности и отработанных препаратов должна соответствовать требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10, СП 1.3.3118-13 и ГОСТ Р 51088.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ*

- Дозаторы пипеточные одно- и многоканальные:

дозаторы переменного объема, для внесения реагентов в лунки планшета от 1 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования с погрешностью не более 3 %;

восьми-двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета, позволяющие отбирать объемы жидкостей до 400 мкл, или устройство

- устройство для промывки микропланшетов, «BIO-RAD», модель PW40;
- термостат суховоздушный, модель ТС-1/80 СПУ;
- фотометр для микропланшетов, «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США. Модель 680;
- холодильник бытовой «Стинол»;
- цилиндр мерный второго класса точности вместимостью 1000 мл;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- вода очищенная.

* При отсутствии вышеперечисленного оборудования и материалов допускается использование других средств, имеющих характеристики не хуже приведенных

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Минимальный объем исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови не менее 20 мкл.

Исследование образцов проводят в первые сутки после забора. Допустимо использование образцов, хранившихся при температуре от 2 °С до 8 °С не более семи суток либо при температуре от минус 23 °С до минус 17 °С не более шести месяцев.

Образцы, содержащие взвешенные частицы, перед исследованием следует центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин для исключения неправильного результата анализа.

Проросшие, гемолизированные, гиперлипидные образцы, а также образцы, подвергшиеся повторной заморозке — оттаиванию, исследованию не подлежат.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Несоблюдение описанных ниже требований может привести к искажению результатов анализа.

7.1.1 Не использовать реагенты с истекшим сроком годности.

7.1.2 Для приготовления рабочего раствора хромогена использовать одноразовые емкости и наконечники для дозаторов. Мерный цилиндр и емкость для приготовления промывочного раствора, многоразовые емкости для подготовки реагентов к работе должны быть тщательно вымыты и промыты водой очищенной, желательна их стерилизация.

7.1.3 При ручной промывке полностью заполнять лунки иммуносорбента (от 380 до 400 мкл в лунку), не допуская переливания промывочного раствора через края лунок, и не касаясь лунок наконечниками. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок. При использовании автоматического устройства для промывки микро-планшетов рекомендуется использовать режим отмывки с переполнением «Overflow» (с внесением в лунки иммуносорбента от 600 до 700 мкл промывочного раствора) и режим окончательной аспирации «Crosswise».

7.1.4 Не допускать высыхания лунок иммуносорбента между отдельными операциями.

7.1.5 Ванночки, в случае повторного использования для работы с рабочими растворами конъюгатов и хромогена, не обрабатывать дезинфицирующими

едствами. При повторном использовании ванночку

для рабочего раствора конъюгатов промыть проточной водой и тщательно ополоснуть водой очищенной. При повторном использовании ванночку для рабочего раствора хромогена сразу после работы промыть 70 % раствором этилового спирта и тщательно ополоснуть водой очищенной. Никогда не использовать одну и ту же ванночку для рабочих растворов конъюгатов и рабочего раствора хромогена.

7.1.6 При использовании автоматического промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста. Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать раствором 70 % этилового спирта и затем водой очищенной.

7.1.7 Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только раствором 70 % этилового спирта, не использовать во время проведения ИФА перекись водорода и другие содержащие активный кислород, хлорамин и другие содержащие активный хлор вещества.

7.1.8 Для инактивации и дезинфекции отходов реагентов набора, вспомогательных материалов и исследуемых образцов рекомендуется использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА (которые не содержат активные кислород и хлор, ионы тяжелых металлов), например, рекомендуются средства на основе спиртов, третичных аминов или четвертичных аммониевых соединений.

7.1.9 Пленка для заклеивания лунок иммуносорбента является одноразовой и повторному использованию после снятия не подлежит. При использовании части набора необходимо отрезать кусок пленки нужного размера для каждой стадии инкубации.

7.2 Приготовление реагентов

7.2.1 Приготовление иммуносорбента

Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся стрипы вынуть из рамки и упаковать в пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыв пластиковую застежку.

Хранение: неиспользованные стрипы иммуносорбента в пакете с влагопоглотителем в течении срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2.2 Приготовление промывочного раствора

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т. При выпадении солей прогреть в термостате при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т, развести его водой очищенной согласно Таблице 1 и тщательно перемешать. При использовании целого флакона ФСБ-Т развести его содержимое до 650 мл водой очищенной и тщательно перемешать.

Хранение: промывочный раствор - не более 12 часов при температуре от 17 °С до 27°С, не более семи суток при температуре от 2 °С до 8 °С. Неиспользованный ФСБ-Т - в закрытом флаконе в течении срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2.3 Приготовление РБР-С и стоп-реагента

РБР-С и стоп-реагент готовы к применению.

необходимое количество согласно Таблице 1. При использовании целого набора вылить в ванночку все содержимое флакона.

Хранение: неиспользованные РБР-С и стоп-реагент в закрытых флаконах в течении срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2.4 Приготовление контрольных образцов К+ и К-

К+ и К- готовы к применению.

Для использования отобрать пипеткой с новым сменным наконечником необходимые объемы из флаконов.

Хранение: неиспользованные К+ и К- в закрытых флаконах в течении срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

Таблица 1. Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
На приготовление промывочного раствора												
ФСБ-Т, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Вода очищенная, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Готовые к применению реагенты												
РБР-С, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	10,5	11,0
Стоп-реагент, мл	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
На приготовление рабочего раствора конъюгата												
Кг анти-IgM и (или) Кг анти-IgG, мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
РБР-К, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
На приготовление рабочего раствора хромогена												
ТМБ, мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
БРС, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

7.2.5 Приготовление рабочих растворов конъюгатов

Рабочий раствор любого конъюгата (или совместно обоих конъюгатов) готовить в ванночке с учетом требований 7.1.5 за пять - десять минут перед внесением в лунки иммуносорбента с использованием новых сменных наконечников. Избегать попадания под прямые солнечные лучи.

В ванночку отобрать необходимый объем Кг анти-IgM и Кг анти-IgG (при первичном скрининге), либо одного из конъюгатов (при подтверждении стадии заболевания/проверке эффективности вакцинации) в зависимости от количества используемых стрипов согласно Таблице 1. Добавить к нему соответствующий объем РБР-К, тщательно перемешать.

Хранение: рабочий раствор конъюгата не более 10 мин до использования при температуре от 17 °С до 27 °С, неиспользованные Кг и РБР-К в закрытых флаконах в течении срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2.6 Приготовление рабочего раствора хромогена

Рабочий раствор хромогена готовить в ванночке с учетом требований 7.1.5 за пять - десять минут до внесения в лунки иммуносорбента с использованием новых сменных наконечников. Избегать попадания под прямые солнечные лучи.

В ванночку отобрать необходимый объем ТМБ в зависимости от количества используемых стрипов согласно Таблице 1. Добавить к нему соответствующий объем БРС, тщательно перемешать.

Хранение: рабочий раствор хромогена не более 10 мин до использования при температуре от 17 °С до 27°С, неиспользованные ТМБ и БРС в закрытых флаконах в течении срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.3 Проведение иммуноферментного анализа

Перед постановкой реакции все реагенты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 17 °С до 27 °С.

7.3.1 Внести во все предназначенные для исследуемых образцов лунки иммуносорбента по 80 мкл РБР-С. В одну любую пустую лунку дополнительно внести 100 мкл РБР-С для контроля правильной работы рабочих растворов конъюгата и хромогена.

Внесение положительного и отрицательного контролей: в одну любую пустую лунку внести 100 мкл К+, в две другие пустые лунки внести по 100 мкл К-. При постановке ИФА на одном или двух стрипах такая схема постановки контролей обязательна. При одновременной постановке анализа на двух и более планшетах такая схема постановки контролей обязательна для каждого планшета.

В лунки с 80 мкл РБР-С внести по 20 мкл исследуемых образцов, тщательно перемешав пипетированием. Все лунки иммуносорбента заклеить пленкой.

Иммуносорбент инкубировать 30 мин в термостате при температуре (37±1) °С.

7.3.2 По окончании инкубации содержимое лунок иммуносорбента собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором и удалить влагу как описано в 7.1.3 и 7.1.4.

7.3.3 Приготовить рабочий раствор конъюгата как описано в 7.2.5.

Во все лунки иммуносорбента внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. При внесении учитывать требования 7.1.5. Все лунки иммуносорбента заклеить пленкой.

Иммуносорбент инкубировать 30 мин в термостате при температуре (37±1) °С.

7.3.4 По окончании инкубации содержимое лунок иммуносорбента собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором и удалить влагу как описано в 7.1.3 и 7.1.4.

7.3.5 Приготовить рабочий раствор хромогена как описано в 7.2.6.

Во все лунки иммуносорбента внести по 100 мкл рабочего раствора хромогена. При внесении учитывать требования 7.1.5. Все лунки иммуносорбента заклеить пленкой.

Защищенный от света иммуносорбент инкубировать 15 мин в термостате при температуре (37±1) °С.

7.3.6 Реакцию остановить добавлением во все лунки иммуносорбента по 50 мкл стоп-реагента.

Время между остановкой реакции и регистрацией результатов не должно превышать 15 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью планшетного ридера, измеряя оптическую плотность (ОП) с основным фильтром с длиной волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Результаты анализа учитывать только при соблюдении следующих условий.

9.1 Каждое значение ОП в лунках с К- (ОП К-) не более 0,200.

9.2 Значение ОП в лунке с контролем конъюгата (К Кг) не более 0,150.

9.3 Значение ОП в лунке с К+ (ОП К+) более 0,500.

По результатам анализа рассчитать значение критической оптической плотности (ОП_{крит.}) по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит.}} = \text{ОП (К-)}_{\text{ср.}} + 0,2 \quad (1)$$

где ОП (К-)ср. - среднее значение двух (ОП К-).

Для интерпретации результатов анализа использовать коэффициент позитивности (КП):

$$\text{КП} = \text{ОП ИО} / \text{ОП}_{\text{крит.}} \quad (2)$$

где ОП ИО — ОП исследуемого образца.

Если $\text{КП} \leq 1$, результат интерпретировать как отрицательный.

Если $\text{КП} > 1$, результат интерпретировать как положительный.

Положительный результат для образца от пациента с подозрением на БВВЭ, в анализе при совместном использовании анти-IgG и анти-IgM, следует подтвердить повторением ИФА в двух лунках этого же набора, но в анализе при раздельном использовании анти-IgG и анти-IgM. При воспроизведении положительного результата хотя бы в одной из лунок, считать положительный результат подтвержденным. В противном случае исследовать новую порцию сыворотки (плазмы) по той же схеме.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Срок годности набора реагентов «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» 12 месяцев.

Набор реагентов «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» хранить и транспортировать при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 27 °С не более пяти суток. Не допускать замораживания.

Срок годности вскрытых компонентов изделия – в течение срока годности серии набора, срок годности приготовленных для работы рабочих растворов конъюгатов и хромогена - не более 10 мин до использования при температуре от 17 °С до 27°С (см. 7.2).

«Только для диагностики ин витро».

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» направлять на предприятие-изготовитель: 630559, Россия, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. (383) 336-60-10, факс (383) 336-74-09.

Заведующий лабораторией
производства средств иммунодиагностики
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

 С.А. Пьянков

Зав ОБТК
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

 М.П. Богрянцева

Директор ФКУЗ «Российский
научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора
академик РАН, д.м.н., профессор





В.В. Кутырев

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ АПРОБАЦИИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» на базе испытательного лабораторного центра ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора)

1 Всего было исследовано 150 образцов сыворотки и 356 образцов плазмы крови. Результаты приведены в таблице:

Образец	Положительные образцы*	Подтверждённые Положительные образцы	Отрицательные образцы*	Подтверждённые отрицательные образцы
Сыворотка крови	22	22	128	128
Плазма крови	103	103	253	253

* Согласно интерпретации результатов инструкции по применению «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин»

Диагностическая чувствительность. 22 образца сыворотки и 103 образца плазмы крови реконвалесцентов и больных лихорадкой Эбола были протестированы набором реагентов «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин». При скрининге (совместное выявление антител классов М и G) все 125 образцов выявлены как положительные. При подтверждении (раздельное выявление классов антител) получено 125 положительных результатов. Диагностическая чувствительность составила не менее 98 %.

Специфичность. 128 образцов сыворотки и 253 образца плазмы крови здоровых доноров и больных, в том числе различными геморрагическими лихорадками (не Эбола), были протестированы набором реагентов «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин». Результат отрицательный в 100 % случаев во всех вариантах постановки. Диагностическая специфичность составила не менее 99 %.

