

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"

В.Ю.Борисов

"01" 11 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов
класса G к вирусу герпеса человека 6 типа»
«ИФА-ВГЧ6-IgG».

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу герпеса человека 6 типа» «ИФА-ВГЧ6-IgG» предназначен для качественного и полуколичественного выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу герпеса человека 6 типа (Human Herpes Virus type 6, HHV-6) в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики in vitro.

Показания и противопоказания к применению изделия

Изделие предназначено для обследования больных при подозрении на герпесвирусную инфекцию 6 типа и с целью определения состояния иммунного статуса пациента к данному вирусу.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Герпесвирусные инфекции являются причиной развития многих соматических и онкологических заболеваний, занимают ведущее место среди причин мертворождаемости, преждевременных родов, младенческой смертности, заболеваемости новорожденных, способствуя ранней инвалидизации детей. Это обстоятельство обусловлено рядом причин: повсеместным распространением герпесвирусов, многообразием вызываемых заболеваний, существованием в организме человека в разных формах (острых, хронических, латентных).

Герпесвирусы (*Herpesviridae*) — это большое семейство ДНК-содержащих вирусов, вызывающих разнообразные болезни у человека и других млекопитающих. Различают 8 представителей семейства герпесвирусов, поражающих человека. Одним из них является вирус герпеса человека 6-го типа (HHV-6). Он относительно недавно был внесен в список известных человеческих патогенов и является серьезным претендентом на роль этиологического агента таких заболеваний, как рассеянный склероз, энцефалит, лихорадка у детей с судорожным синдромом, инфекционный мононуклеоз, «внезапная экзантема». Существуют данные о том, что ВГЧ-6 является кофактором СПИДа, некоторых форм карцином шейки матки и назофарингеальных карцином.

Серологические исследования показали повсеместность случаев ВГЧ-6-инфекции. Инфицирование происходит обычно на первом или втором году жизни, и соответственно около 95% взрослых имеют антитела к ВГЧ-6. По данным российских авторов, у 80% здоровых доноров, у 65% ВИЧ-инфицированных и 73% онкологических больных выявляются антитела к ВГЧ-6. При рождении большинство детей серопозитивны за счет материнских антител, титр которых снижа-

ется 5 мес. Однако к концу первого года жизни процент серопозитивных малышей оказывается таким же, как среди старших детей и взрослых.

ВГЧ-6 сходен с остальными герпесвирусами, но отличается от них по биологическим, иммунологическим свойствам, спектру чувствительных клеток, антигенной структуре, составу генома, количеству и молекулярной массе структурных вирусных белков. При диагностике ВГЧ-6 чаще всего применяются иммунохимический (ИФА) и молекулярно-биологический (ПЦР, гибридизация) методы. Существует так же целый ряд серологических методов определения ВГЧ-6-инфекции: иммунофлюоресцентный метод, иммуноферментный анализ (ИФА), иммуноблот, иммунопреципитация. Иммуноферментный анализ используется наиболее часто.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	Рекомбинатный очищенный антиген вируса герпеса 6 типа, сорбированный на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном (используются "ломающиеся" стрипы)	1 планшет
<i>допускается раздельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)</i>		
Контрольный положительный образец (K ⁺)	Инактивированный; жидкая сыворотка крови человека, содержащая антитела класса G к ВГЧ-6; прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (1,5 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	Инактивированный; жидкая сыворотка крови человека, не содержащая антитела класса G к ВГЧ-6, прозрачная жидкость зеленого цвета	1 фл. (3,0 мл)
Конъюгат	антитела моноклональные мышиные против иммуноглобулинов человека класса G, меченые пероксидазой хрена; прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета	1 фл. (12,0 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	прозрачная жидкость розового цвета, возможно выпадение осадка, исчезающего при встряхивании	1 фл. (24 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т (x25))	прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	2 фл. (по 40 мл)
Раствор индикаторный (РИ)	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (12 мл)
Вспомогательный планшет для предварительного разведения образцов		1 шт.
Одноразовые наконечники для автоматических пипеток		16 шт.

Примечания.

1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т (x25), РИ, РРО, стоп-реагент – унифицированы для ряда наборов ЗАО "ЭКО-лаб", в которых используются указанные реагенты.

3. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

4. В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Набор дополнительно укомплектован принадлежностями:

вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),

клеякой пленкой для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации набора позволяет одномоментное исследование 96 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется от 2 до 4 лунок). Предусмотрена возможность проведения раздельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Лунок для контр.	4	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Число иссл. обр.	1-4	5-9	10-17	18-25	26-33	34-41	42-49	50-57	58-65	66-73	74-81	82-89

Методы стерилизации изделия

Изделие не требует стерилизации.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемом образце иммуноглобулинов класса G к вирусу герпеса 6 типа происходит связывание их с антигенами, сорбированными в лунках планшета-иммуносорбента, образовавшийся комплекс антиген-антитело реагирует с внесенным в реакционную среду раствором конъюгата – антителами к IgG человека, мечеными пероксидазой хрена. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело-конъюгат" выявляется в реакции с субстратно-индикаторным раствором, содержащим хромоген – тетраметилбензидин, в результате которой меняется цвет (оптическая плотность) реакционной смеси в лунке планшета; изменение регистрируется спектрофотометрически.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Нативная сыворотка, плазма (с гепарином, цитратом натрия, ЭДТА) крови человека объемом не менее 10 мкл.

Образцы сыворотки (плазмы) крови до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С. При необходимости хранения образцов более 7 дней рекомендуется разделить их на аликвоты и хранить при температуре от минус 20 до минус 70 °С. Размороженные образцы перед исследованием нужно тщательно перемешать. При работе с размороженными образцами следует учитывать, что каждый цикл оттаивания-замораживания приводит к разрушению выявляемых антител, снижая качество исследуемого материала. С целью получения достоверных результатов исследования рекомендуется использовать только однократное замораживание-оттаивание образцов.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

При исследовании образцов с содержанием до 200 г/л гемоглобина, 120 мкмоль/л билирубина и 11 ммоль/л триглицеридов интерференция не наблюдалась.

Перекрестных реакций, обусловленных наличием общих антигенных детерминант возбудителей герпесвирусных инфекций (ГВИ) (цитомегаловирус, вирусы герпеса 1, 2, Варицелла Зостер (ветряная оспа), Эпштейн Барр) не выявлено.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность набора определяется по стандартной панели положительных сывороток предприятия, содержащих иммуноглобулины класса G к вирусу герпеса 6 типа (СОП⁺-256), как процентное содержание положительных образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность набора определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия (СОП⁻-256), не содержащих иммуноглобулины класса G к вирусу герпеса 6 типа,

к 7 процентное содержание отрицательных образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 99,34% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,66% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови: 98,17% - 100%;

Плазма крови: 98,98% - 100%;

Диагностическая специфичность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови: 99,38% - 100%;

Плазма крови: 98,98% - 100%;

Воспроизводимость результатов составила 100%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003).

РРО содержит натрия азид в безопасной концентрации. Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» относится к классу А - отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными. Класс А – эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам (ТБО).

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

Перечень рисков, идентифицированных в процессе анализа риска, и способы управления ими представлены отдельным документом.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы (для "ручной" постановки)

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Анализатор иммуноферментный автоматический.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин.

Холодильник бытовой.

Фильтровальная бумага.

Термостат на 37 °С.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70%-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Предварительное разведение исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести 1:10 во вспомогательном планшете. Для этого внести в его лунки по 90 мкл РРО и добавить по 10 мкл сыворотки, тщательно перемешать пипетированием. При этом розовый цвет должен измениться на желтый.

Если изменение цвета не произошло, данный образец необходимо исследовать повторно с целью исключения неправильных результатов. Рабочее разведение (1:100) готовить непосредственно в лунках иммуносорбента (см. раздел Проведение ИФА ("ручная" постановка), п. 2).

Предварительные разведения образцов (1:10) хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление рабочего промывочного раствора

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т (х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

При постановках с использованием ИФА-анализаторов 80 мл ФСБ-Т (х25) довести водой очищенной до 2 л.

При дробной "ручной" постановке использовать соотношения объемов ФСБ-Т (х25) и воды, указанные в табл. 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1

Число стрипов	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т (х25), мл	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищенная, мл	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 30 сут, при температуре от 18 до 25 °С – не более 13 часов.

Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, K^+ , K^- , конъюгат, РРО, РИ, стоп-реагент – готовы к применению.

Проведение ИФА ("ручная" постановка)

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из пакета планшет, вскрыв его выше замка «zip-lock» и установить на рамку необходимое для проведения ИФА количество стрипов. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник. Хранение вскрытого иммуносорбента возможно при температуре 2-8 °С до истечения срока годности набора.

2. Внести в лунки А1, В1, С1 по 100 мкл контрольных образцов (в 1 лунку – K^+ и в две – K^-), оставшиеся лунки использовать для исследуемых образцов (по 1 лунке на образец), для чего внести в них: вначале по 90 мкл РРО, а затем – по 10 мкл образцов, предварительно разведенных 1:10 в лунках вспомогательного планшета (см. раздел «Предварительное разведение исследуемых образцов»), тщательно перемешать пипетированием.

3. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой, инкубировать 30 мин при температуре 37 °С в защищенном от света месте.

4. С помощью промывателя удалить содержимое лунок, 4 раза промыть планшет промывочным раствором, внося в лунки 350-370 мкл раствора. При наличии промывателя, позволяющего производить промывку в режиме "Overflow", использовать именно этот режим. По окончании промывки остатки раствора удалить из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата.
6. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой, инкубировать 30 мин при температуре 37⁰С в защищенном от света месте.
7. С помощью промывателя удалить содержимое лунок, 4 раза промыть планшет как указано в п. 4.
8. Во все лунки внести по 100 мкл раствора индикаторного, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и инкубировать 15 мин при температуре от 21 до 25⁰С.
9. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился раствор индикаторный) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и не более чем через 10 мин приступить к учету результатов.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм.

Результаты ИФА учитываются при следующих условиях:

Значение ОП_{К+} – не менее 1,0;

среднее значение ОП_{К-} – не более 0,15.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Вычислить критическое значение оптической плотности по формуле:

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср.К^-} + 0,20$$

где ОП_{ср.К⁻} – среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом, измеренное в двухволновом режиме 450/620-655 нм или только с фильтром 450 нм.

Исследуемые образцы учитывать:

как положительные (содержащие иммуноглобулины класса G к вирусу герпеса человека 6 типа) при ОП_{обр} выше ОП_{крит.}, т.е. при ОП_{обр} > ОП_{крит.};

как отрицательные (не содержащие иммуноглобулины класса G к вирусу герпеса человека 6 типа) при ОП_{обр} ниже или равно 0,8хОП_{крит.}, т.е. при ОП_{обр} ≤ 0,8хОП_{крит.}.

как сомнительные при ОП_{обр} в диапазоне от 0,8хОП_{крит.} до ОП_{крит.}, т.е. при ОП_{крит.} ≤ ОП_{обр} < 0,8хОП_{крит.}.

При получении отрицательного или неопределенного результата рекомендуется исследовать сыворотку пациента через 7-14 дней одновременно с первым образцом.

Оценка анализа по индексу позитивности

При необходимости результаты анализа можно оценить по индексу позитивности (ИП_{обр}):

Рассчитайте индекс позитивности (ИП_{обр}) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделить на значение ОП_{крит.}.

$$ИП_{обр} = ОП_{обр} / ОП_{крит.}$$

где ОП_{обр} – оптическая плотность исследуемых образцов в разведении 1:100;

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих ОП_{обр} > 3,5 о.е., использовать формулу:

$$ИП_{обр} = 3,2 \times ОП_{обр} / ОП_{крит.}$$

где ОП_{обр} – оптическая плотность исследуемых образцов в разведении 1:100

Интерпретация результатов

Исследуемые образцы учитывать:

как положительные при ИП_{обр} больше 1, т.е. ИП_{обр} > 1;

как отрицательные при ИП_{обр} меньше или равно 0,8, т.е. ИП_{обр} ≤ 0,8.

Исследуемые образцы учитывать как сомнительные при ИП_{обр} в диапазоне от 0,8 до 1, т.е. при 1 ≥ ИП_{обр} > 0,8.

Образцы, оцененные как сомнительные, должны быть исследованы повторно. При повторном получении сомнительных результатов рекомендуется мониторинг иммунного статуса

...нта для исключения неспецифических, в том числе перекрестных реакций, приводящих к сомнительным результатам.

Полуколичественный учет результатов (определение титра)

Тест-система позволяет выполнить определение титра антител в выявленном положительном образце. Для этого, на отдельном стрипе необходимо провести ИФА с соответствующим образцом в последовательных двукратных разведениях его раствором РРО от 1:100 до 1:12800.

Для приготовления указанных разведений в верхнюю лунку стрипа внести 180 мкл раствора РРО, в остальные лунки стрипа – по 100 мкл раствора РРО. Затем в верхнюю лунку стрипа внести 20 мкл выявленного положительного образца, предварительно разведенного 1:10 в лунках вспомогательного планшета (см. раздел «Предварительное разведение исследуемых образцов»), тщательно перемешать пипетированием и перенести 100 мкл полученного разведения (1:100) во вторую лунку, тщательно перемешать пипетированием, перенести 100 мкл полученного разведения (1:200) в третью лунку и так – до последней лунки стрипа. Из последней лунки стрипа отобрать 100 мкл разведения (1:12800) и слить его в дезинфицирующий раствор.

Рекомендуемая схема титрования положительного образца

	Титр
A	1:100
B	1:200
C	1:400
D	1:800
E	1:1600
F	1:3200
G	1:6400
H	1:12800

Далее провести ИФА как указано в п. Проведение ИФА ("ручная" постановка).

Титром IgG к вирусу ВГЧ-6 считается максимальное разведение, при котором получен положительный результат: значение ОП в соответствующей лунке не менее ОП_{крит}.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Замораживание не допускается.

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Транспортирование

Замораживание не допускается. Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производство имеет сертифицированную на соответствие требованиям международных стандартов ISO 9001:2015, ISO 13485:2003 систему менеджмента качества.

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу герпеса человека 6 типа в сыворотке (плазме) крови» «ИФА-ВГЧ6-IgG», соответствует Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности.

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ИФА-ВГЧ6-IgG», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факсе (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК.

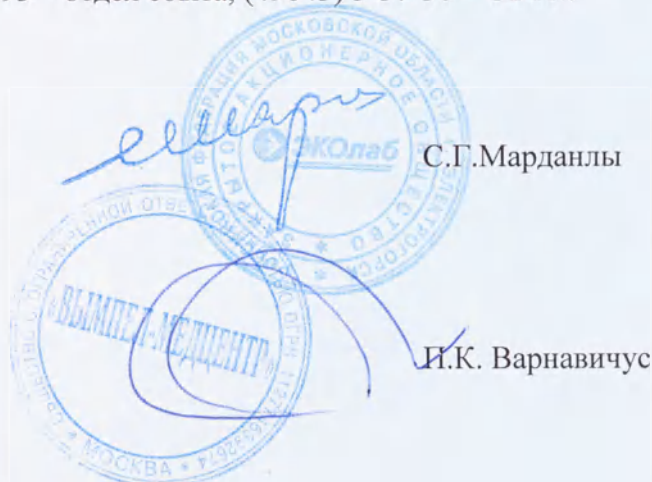
Директор ЗАО "ЭКОлаб" по науке

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

«01» 11 2019 г.



КРАТКАЯ СХЕМА ИФА (ИФА-ВГЧ6-IgG)

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в лунку A1 - 100 мкл K ⁺ , в лунки B1, C1 - 100 мкл K ⁻ в остальные лунки – вначале по 90 мкл РРО, а затем – по 10 мкл образцов, предварительно разведенных 1:10 в лунках вспомогательного планшета (см. раздел «Предварительное разведение исследуемых образцов»)
Инкубация	30 мин, 37 °C
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	во все лунки по 100 мкл конъюгата
Инкубация	30 мин, 37 °C
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	по 100 мкл раствора индикаторного в каждую лунку
Инкубация	15 мин, 21-25 °C
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ

«01» 11 2019 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичко П.К.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

8 лист 06
Ген. Директор ЗАО «ЭКОлаб»
Борисов В.Ю.
«01» 11 2019 г.



ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса G
к человеческому герпес-вирусу 6 типа
в сыворотке (плазме) крови

ВектоННУ-6-IgG

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-2166

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ВектоННВ-6-IgG» (далее по тексту – набор) предназначен для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к человеческому герпес-вирусу 6 типа (*human herpes virus type 6*, ННВ-6) в сыворотке (плазме) крови человека.

Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Для исследования небольшой партии проб возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

Набор реагентов может быть использован для проведения сероэпидемиологических исследований.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения IgG к ННВ-6 основан на твердофазном непрямом иммуноферментном анализе с использованием очищенного рекомбинантного белка р-100.

Во время первой инкубации происходит связывание содержащихся в анализируемом образце специфических антител к вирусу с антигеном ННВ-6, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок планшета.

Во время второй инкубации связавшиеся антитела взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена.

Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации специфических IgG к HHV-6 в анализируемом образце.

2.2. Состав набора

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов, «домашних» по 1 лунке) с иммобилизованным на внутренней поверхности антигеном HHV-6, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K⁺) – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец (K⁻) – 1 фл., 3,0 мл;
- конъюгат антител к IgG человека с пероксидазой хрена; концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 фл., 10 мл;
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 фл., 12 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РРК) – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 фл. по 28 мл;
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл;

- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток – 16 шт.;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

3.1. Обеспечение безопасности персонала Обращение с компонентами набора

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 пораженный участок промыть большим количеством проточной воды.

Обращение с исследуемыми образцами

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 клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать в соответствии п. 3.2. настоящей инструкции и согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998).

Порядок утилизации или уничтожения компонентов набора

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

3.2. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

– для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (перекись водорода, деохлор, хлорамин), в помещениях, где проводят ИФА, приводит к серьезному искажению результатов;

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором субстрата;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

– рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

– никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

– перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо обрабатывать конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона с раствором ТМБ;

– если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

– Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.

– Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

– Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

– Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

– Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

Ложноположительные результаты могут быть обусловлены:

а) получением неправильного рабочего разведения исследуемых сывороток (например, 1:70; 1:50);

б) контаминацией отрицательных сывороток в рабочем и вспомогательных планшетах положительными сыворотками крови из соседних лунок; вероятность такой контаминации особенно высока при первичном скрининге исследуемых сывороток, так как на весь планшет часто выявляется всего несколько отрицательных сывороток.

Для получения правильного рабочего разведения исследуемых сывороток необходимо:

а) при отборе 10 мкл сыворотки для предварительного разведения не погружать наколечник глубоко в сыворотку, чтобы исключить налипание сыворотки на внешнюю поверхность наконечника.

б) тщательно перемешивать сыворотку при предварительном разведении 1:10.

Для исключения взаимной контаминации сывороток во вспомогательном планшете для

предварительного разведения сывороток и в рабочем планшете необходима тщательная и аккуратная работа, без разбрызгивания растворов.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором необходимо следующее дополнительное оборудование и материалы:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм, 405 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм или в одноволновом режиме при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные и многоканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- промыватель ручной или автоматический;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100, 1000 мл;
- вода дистиллированная.

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

На один анализ потребуется 10 мкл сыворотки крови человека.

Требования к образцам

Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 14 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 6 мес. Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

Образцы сывороток крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C .

6. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИФА

Перед проведением анализа вскрыть упаковку набора, извлечь все компоненты, в том числе и запечатанный пакет с планшетом. Выдержать все компоненты набора и анализируемые образцы при температуре от 18 до 25°C не менее 60 мин.

Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение 3 месяцев после первого вскрытия, но в пределах срока годности набора.

Контрольные образцы, раствор ТМБ и стоп-реагент готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

6.1. Подготовка планшета

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

Хранение: при температуре от 2 до 8°C в течение 3 месяцев.

6.2. Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток. Для этого внести в лунки вспомогательного планшета по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки, тща-

тельно 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.

Хранение: при 18–25°C не более 3 ч.

6.3. Приготовление промывочного раствора

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

Хранение: не более 5 суток при 2–8°C.

6.4. Приготовление рабочего раствора конъюгата

В зависимости от числа используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата, добавить соот-

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	РРК, мл		ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистил вода, мл
1	0.1	1.0	1.0	2.0	до 50
2	0.2	2.0	2.0	4.0	до 100
3	0.3	3.0	3.0	6.0	до 150
4	0.4	4.0	4.0	8.0	до 200
5	0.5	5.0	5.0	10.0	до 250
6	0.6	6.0	6.0	12.0	до 300
7	0.7	7.0	7.0	14.0	до 350
8	0.8	8.0	8.0	16.0	до 400
9	0.9	9.0	9.0	18.0	до 450
10	1.0	10.0	10.0	20.0	до 500
11	1.1	11.0	11.0	22.0	до 550
12	1.2	12.0	12.0	24.0	до 600

ветствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Хранение: до 3 часов при 18–25°C.

6.5. Подготовка раствора тетраметилбензидина

Раствор ТМБ готов к использованию. Исключить воздействие прямого света на раствор

14

D-2166

тетраметилбензидина. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

Утилизировать раствор тетраметилбензидина, оставшийся в ванночке или флаконе после проведения ИФА (не сливать во флакон с исходным раствором).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

7.1. Внесение образцов

Раствор РРК перед использованием перемешать встряхиванием.

Внести контрольные образцы:

- 1 лунка – 100 мкл K^+ ;
- 2 лунки – по 100 мкл K^- .

Например, в лунки А-1 и В-1 внести по 100 мкл K^- , в лунку С-1 внести 100 мкл K^+ .

D-2166

15

Внести исследуемые образцы:

Для скрининга в остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 6.2.), тщательно перемешать пипетированием.

Для определения титра в выявленных положительных образцах в лунки верхнего ряда А-2 – А-12 внести по 180 мкл раствора для разведения сывороток и по 20 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 6.2.), тщательно перемешать пипетированием. В лунки рядов В-Н внести по 100 мкл РРС. Многоканальной пипеткой перенести по 100 мкл разведенных исследуемых образцов из лунок верхнего ряда в лунки второго ряда, перемешать (контрольные образцы не титровать). Из лунок второго ряда – в лунки третьего ряда, перемешать. Так же последовательно перенести до последнего ряда. Из последнего ряда удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором по 100 мкл содержимого лунок. Таким образом, в вертикальных рядах получатся последовательные 2-кратные разведения исследуемых образцов в интервале от 1:100 до 1:12800.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок планшета.

7.2. Инкубация

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37°C.

7.3. Промывка

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 (п. 6.3.), 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. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.4. Внесение конъюгата

В лунки планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 6.4.).

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.5. Инкубация

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37°C.

7.6. Промывка

По окончании инкубации промыть планшет как описано выше.

7.7. Внесение ТМБ

Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ (п. 6.5.).

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.8. Инкубация

Планшет выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре 18–25°C.

7.9. Внесение стоп-реагента

Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина.

Краткая схема проведения ИФА приведена в приложении 1 в конце настоящей инструкции.

7.10. Проведение измерений

Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение без использования референс-фильтра.

В случае необходимости оценки результатов по коэффициенту позитивности провести повторное измерение ОП в режиме: основной фильтр – 405 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение без использования референс-фильтра.

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

8. УСЛОВИЯ ПРАВИЛЬНОСТИ РАБОТЫ НАБОРА

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если при измерении в двухволновом режиме 450 / 620–655 нм (или только с фильтром 450 нм) будут выполнены следующие условия:

– среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом не более 0,25 ед. опт. плотн. (о.е.);

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом не менее 0,8 о.е.

9. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Вычислить критическое значение оптической плотности по формуле:

$$ОП_{крит.} = ОП_{450ср.} \cdot K^- + 0,3,$$

где $ОП_{450ср.}$ K^- среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом, измеренное в двухволновом режиме 450 / 620–655 нм (или только с фильтром 450 нм).

Результат анализа **положительный**, если $ОП_{обр.} \geq ОП_{крит.}$, где $ОП_{обр.}$ – оптическая плотность исследуемого образца.

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

Результат анализа **неопределенный**, если соответствующее ему значение $ОП_{обр.}$ попадает в интервал от $0,8 \times ОП_{крит.}$ до $ОП_{крит.}$.

В случае отрицательного или неопределенного результата анализа при необходимости рекомендуется исследовать сыворотку пациента через 7–14 дней одновременно с первым образцом.

При определении титра в выявленных положительных образцах за титр IgG к HHV-6 принимается последнее разведение исследуемого образца, при котором значение ОП в соответствующей лунке не менее $ОП_{крит.}$.

Результаты анализа можно оценить по коэффициенту позитивности (КП), рассчитывая отношение ОП в лунке с образцом пациента относительно $ОП_{крит.}$

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих $ОП_{450} \leq 3,5$ о.е., использовать формулу:

$$КП_{обр.} = \frac{ОП_{450\text{ обр.}}}{ОП_{450\text{ крит.}}},$$

где $ОП_{450\text{ обр.}}$ – ОП образца, полученная в двухволновом режиме 450 / 620–655 нм (или только с фильтром 450 нм).

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих $ОП_{450} > 3,5$ о.е., использовать формулу:

$$КП_{обр.} = 3,2 \times \frac{ОП_{405\text{ обр.}}}{ОП_{450\text{ крит.}}},$$

где $ОП_{405\text{ обр.}}$ – ОП образца, полученная в двухволновом режиме 405 / 620–655 нм (или только с фильтром 405 нм).

Результат анализа **положительный**, если $КП_{обр.} \geq 1$, где $КП_{обр.}$ – коэффициент позитивности исследуемого образца.

Результат анализа **отрицательный**, если $КП_{обр.} \leq 0,8$.

Результат анализа **неопределенный**, если соответствующее ему значение $КП_{обр.}$ попадает в интервал от 0,8 до 1,0.

Расчет КП целесообразно проводить для оценки концентрации специфических антител класса G в исследуемых образцах и при наблюдении за изменением концентрации IgG к HHV-6 в динамике в парных образцах сывороток.

Результаты, полученные в иммуноферментном анализе, необходимо оценивать в комплексе с клиническими данными и результатами других диагностических исследований.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации антител к HNV-6 в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Набор реагентов следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (9 мес.). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

По окончании срока годности набор не использовать.

Замораживание набора не допускается.

Дробное использование набора может быть реализовано не позднее **3 месяцев** с даты проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности.

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

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора,

обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:
630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел./факс (383) 363-13-46,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 227-75-43

Приложение 1

Открытый менее 20 лет назад (в 80 годах XX столетия), вирус герпеса человека 6-го типа (HHV-6) относится к подсемейству *Betaherpesvirinae*, роду *Roseolovirus*. Вирус HHV-6 поражает следующие типы клеток: В- и Т-лимфоциты (более 90% инфицированных клеток), моноцитарные макрофаги, глиальные клетки и клетки тимуса.

Диаметр вирионов вируса HHV-6 составляет 140–200 нм. Геном вириона представлен двухнитивой ДНК протяженностью более 110 кВ и содержит 43% пар Г-Ц. Нуклеокапсид имеет кубический тип симметрии, состоит из 162 капсомеров и имеет икосаэдральную форму (правильный двадцатигранник). Размеры нуклеокапсида составляют в среднем 90–125 нм. Вирионы имеют суперкапсидную оболочку.

Исследования изолятов HHV-6 от людей с различной патологией показали наличие двух вариантов – HHV-6A и HHV-6B, отличающихся по клеточному тропизму *in vitro*, рестрикционному эндонуклеазному профилю, нуклеотидной последовательности, реактивности с моноклональными антителами, сероэпидемиологии и причастности к различным заболеваниям. Различия в сероэпидемиологии между вариантами мало известны, но инфекция, индуцированная HHV-6A, наблюдается реже, в отличие от HHV-6B, являющегося основным этиопатогеном внезапной экзантемы (*Exantema subitum*, синоним – *Roseola infantum*). Антитела к HHV-6 обнаруживают у 40–100% населения в зависимости от

возраста, района проживания, социально-экологических условий.

Методами ПЦР и гибридизации *in situ* ДНК HHV-6 была идентифицирована в тканях и клетках биопсированных образцов ходжкинских, смешанных В- и Т-клеточных неходжкинских лимфом. HHV-6 связывают с различными лимфопролиферативными иммуносупрессивными заболеваниями: ангиоиммунобластной лимфаденопатией; африканской лимфомой Беркитта; Т-клеточной острой лимфобластной лейкемией; лимфогранулематозом; инфекционным мононуклеозом, не связанным с вирусом Эпштейна-Барр; внезапной экзантемой новорожденных; злокачественными новообразованиями и аутоиммунной патологией (антитела класса G имеют до 41% больных саркоидозом, особенно с острой начальной стадией (синдром Леффрена) и до 36% пациентов с синдромом Шегрена); некоторыми заболеваниями ЦНС (HHV-6 идентифицирован в нейронах и глиальных клетках; в ядрах олигодендроцитов; в патологических образованиях, характерных для рассеянного склероза – у таких пациентов уровни антител более высокие, чем у здоровых лиц).

Репликация HHV-6 наблюдалась у больных с нарушенным иммунным статусом, иммуносупрессией (вследствие трансплантации органов-почек, печени, костного мозга от серопозитивных доноров; СПИДа и др.).

После трансплантации почек у 8 из 21 пациента наблюдалась реакция отторжения органа, при этом отмечалось значительное увеличение уровня антител

к HHV-6, а у двух из них вирус был выделен из лимфоцитов периферической крови. Выделение HHV-6 из периферических лимфоцитов у 8 из 9 остальных реципиентов отмечалось в среднем в течение 3 лет после трансплантации, что указывает на вероятность инфицирования вирусом почечной ткани, хотя прямых доказательств причинной связи HHV-6 с реакцией отторжения почек нет.

ДНК HHV-6 идентифицирована у пациентов после трансплантации костного мозга. Вирус был выделен у 40% детей после пересадки костного мозга, при этом отмечалось значительное увеличение титров антител к HHV-6.

В результате исследований установлено, что по мере прогрессирования ВИЧ-инфекции у взрослых пациентов наблюдается увеличение частоты выявления ДНК герпесвирусов, в том числе HHV-6. Так, в стадии II В частота выявления нуклеотидной последовательности HHV-6 составляет порядка $26,6 \pm 8,1\%$, а в стадии IIIВ – уже $86,0 \pm 8,6\%$. Особенности взаимодействия HHV-6 и ВИЧ показали, что на фоне обусловленного ВИЧ иммунодефицита может происходить реактивация HHV-6, и, наоборот, HHV-6, подобно ВПГ (вирус простого герпеса) и ЦМВ (цитомегаловирус), может реактивировать ВИЧ, способствуя переходу латентной ВИЧ-инфекции в клинически манифестное заболевание. HHV-6 может играть роль существенного кофактора для ВИЧ.

Доказана этиологическая роль HHV-6 в развитии внезапной экзантемы – заболевания детей в возрасте от 3-х месяцев до 3-х лет. Первичное инфицирование HHV-6

наиболее часто происходит в возрасте 3–6 месяцев, когда исчезают материнские антитела. Около половины всех случаев первой в жизни лихорадки новорожденных связано именно с первичным инфицированием HHV-6. Источник инфекции – больные манифестными и латентными формами болезни и носители HHV-6. Инкубационный период заболевания 5–15 дней. В период лихорадки (и даже в предшествующий период) вирус присутствует в СД4 клетках, в это время вирус выделяется из крови больных более чем в 90% случаев. Антитела к HHV-6 отсутствуют в острой фазе, иммуноглобулины класса М выделяются на 5-й день лихорадки и обнаруживаются в течение 2–3 недель. Иммуноглобулины класса G появляются на 7-й день, концентрация их максимальна через 2–3 недели, затем они персистируют в организме длительное время. Заболевание, как правило, заканчивается без осложнений, но описаны клинические случаи манифестной инфекции с различными симптомами, в том числе респираторные и гастроинтестинальные симптомы, неврологические осложнения (энцефалиты, менингоэнцефалиты, асептический менингит, судороги с последующей эпилепсией). Первичная инфекция среди взрослых наблюдается редко, в основном в форме длительных лимфаденопатий, мононуклеозоподобного синдрома, гепатита и т.д.

HHV-6 связывают также с синдромом хронической усталости, в отличие от внезапной экзантемы – болезни взрослых. Доказана этиологическая роль HHV-6 в возникновении данного синдрома, хотя до сих пор не ясно, связан ли синдром хронической усталости этиологиче-

ски с инфицированием HHV-6, или же заболевание является следствием реактивации латентной инфекции. Источник инфекции – носители вируса HHV-6 и больные с манифестными формами болезни. Заболевание синдромом хронической усталости начинается с повышения температуры тела до субфебрильных цифр, выраженной ночной потливости. На этом фоне отмечаются умеренные катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей, генерализованная лимфаденопатия, в последующем – психические расстройства, проявляющиеся подавленностью, нарушением сна, чувства равновесия. У 85–90% больных развивается хроническая слабость, приводящая к полной потере трудоспособности. Показано превалирование иммуноглобулинов класса М к ранним антигенам HHV-6 Р41/38 у пациентов с синдромом хронической усталости – 60% пациентов позитивны по IgM; 40% – по IgG и 23% из общего числа – по IgM и IgG одновременно. Так, из 160 пациентов у 77% выявлялись специфические IgM и IgG, или те и другие одновременно, в отличие от 12% в контрольной группе здоровых лиц.

Передается вирус HHV-6 различными путями: воздушно-капельным, контактно-бытовым (однако контагиозность низка), половым, при переливании инфицированной крови и пересадке органов и тканей от инфицированных доноров. Возможна вертикальная передача вируса от инфицированной матери плоду как во время беременности, так и после родов. Причем в последнем случае фактором передачи является не грудное молоко, а, вероятнее всего, слюна.

Приложение 2 Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «ВектоHHV-6-IgG»

Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!

- Внести:** по 100 мкл K⁺, K⁻;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл
предварительно разведенных
анализируемых образцов.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора
конъюгата.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора ТМБ.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная
длина волны 620–655 нм.

15.03.17.

ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»

Международные сертификаты
ISO 9001 и ISO 13485

НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИФА

Вирусные гепатиты А, В, С, D, E, G, TT;
ВИЧ-инфекция; ИППП; TORCH-инфекции;
герпесвирусные инфекции; беременность;
аутоиммунные, системные, паразитарные,
желудочно-кишечные заболевания;
гормоны; опухолевые и кардиомаркеры;
цитокины, аллергены и др.

***Точная диагностика –
эффективное лечение!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

Internet: www.vector-best.ru

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
16 лист
Ген. Директор ЗАО "ЭКОлаб"
Борисов В.Ю.
"12" 2019 г.

