

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 2008 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к раннему антигену EA вируса Эпштейна-Барр в сыворотке (плазме) крови (ВектоВЭБ – EA – IgG)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВектоВЭБ – EA – IgG (далее по тексту - набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G (IgG) к раннему антигену EA вируса Эпштейна-Барр в сыворотке (плазме) крови человека.

1.2. Набор может быть использован для диагностики острых стадий заболеваний, обусловленных вирусом Эпштейна-Барр.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 91 неизвестного образца, 5 контрольных образцов, всего 96 определений при использовании всего планшета.

Для исследования небольшой партии проб возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения IgG к раннему антигену EA вируса Эпштейна-Барр основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Основным реагентом набора является очищенный рекомбинантный белок EA, иммобилизованный на поверхности лунок полистиролового

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором НИИ СД М.П. Гришаевым и и.с. лаборатории герпес-вирусных инфекций О.В. Олейник

планшета.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках планшета с иммобилизованным антигеном вируса Эпштейна-Барр. Антитела к вирусу связываются с иммобилизованным антигеном. Несвязавшийся материал удаляют отмывкой. Связавшиеся антитела выявляют посредством инкубации с конъюгатом антител к IgG человека с пероксидазой хрена. После второй отмывки количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность (ОП) растворов в лунках стрипов. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце антител к раннему антигену EA вируса Эпштейна-Барр. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения $OP_{крит}$ анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицательные.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок ранним антигеном EA вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgG к EA ВЭБ, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к EA ВЭБ, готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, концентрат - 1 флакон (1,5 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата (РПК) – 1 флакон (12,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 флакона (по 28,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1 флакон (1,0 мл);

- стоп-реагент – 1 флакон (12,0 мл);
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток на 0,5–200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления IgG к раннему антигену EA вируса Эпштейна-Барр – соответствие результатов определения набором IgG к раннему антигену EA вируса Эпштейна-Барр требованиям стандартной панели предприятия (рег. № СОП 05-2-260), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности в лунках с положительными сыворотками $ОП_{№9-№16} \geq ОП_{крит}$

3.2. Специфичность выявления IgG к раннему антигену EA вируса Эпштейна-Барр – соответствие результатов определения набором IgG к раннему антигену EA вируса Эпштейна-Барр требованиям стандартной панели предприятия (рег. № СОП 05-2-261), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательными сыворотками $ОП_{№1-№8} < ОП_{крит}$.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (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 набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 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.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 650 нм;

– термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °С;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы 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 объёмы жидкостей от 5 мкл до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);

– промывочное устройство для планшетов;

– перчатки резиновые хирургические;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

– цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;

– колба вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– 1,25% раствор велтолена.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 6 мес. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови. После размораживания образцы тщательно перемешать.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить

центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °С не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета.

Непосредственно перед использованием вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов; остальные стрипы снять с рамки и немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы после первого вскрытия пакета можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора.

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

Внести в мерный цилиндр необходимое количество 25×ФСБ-Т и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

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 3 суток.

7.4. Подготовка положительного и отрицательного контрольных образцов.

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

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

7.5. Подготовка исследуемых образцов.

В лунки вспомогательного планшета внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать. При этом малиновый цвет должен измениться на жёлтый. Если изменения цвета не произошло, ИФА данного образца может дать неправильный результат.

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

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в отдельный чистый флакон внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

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

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) отобрать в чистый флакон необходимое количество СБР и добавить необходимое количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

Хранить не более 3 ч при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

Таблица

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Рабочий промывочный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	Концентрат тетраметилбензидина, мкл	Субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Вода дистиллированная, мл
1	0,1	1,0	70	1,0	2,0	48
2	0,2	2,0	140	2,0	4,0	96
3	0,3	3,0	210	3,0	6,0	144
4	0,4	4,0	280	4,0	8,0	192
5	0,5	5,0	350	5,0	10,0	240
6	0,6	6,0	420	6,0	12,0	288
7	0,7	7,0	490	7,0	14,0	336
8	0,8	8,0	560	8,0	16,0	384
9	0,9	9,0	630	9,0	18,0	432
10	1,0	10,0	700	10,0	20,0	480
11	1,1	11,0	770	11,0	22,0	528
12	1,2	12,0	840	12,0	24,0	576

7.9. Внесение контрольных образцов и исследуемых сывороток

В лунку А-1 внести 100 мкл раствора для разведения сывороток (РРС). Лунка А-1 будет являться контролем поглощения субстратного буферного раствора с тетраметилбензидином.

В лунки внести K^+ и K^- по следующей схеме:

- 1 стрип – 1 лунка K^+ и 2 лунки K^-
- 2 стрипа – 2 лунки K^+ и 2 лунки K^-
- 3 и более стрипа – 2 лунки K^+ и 3 лунки K^-

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток (п. 7.5), тщательно перемешать. Раствор для разведения сывороток перед употреблением встряхивать!

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 5-7 мин.

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

7.10. По окончании инкубации содержимое лунок удалить аспирацией в сосуд с дезинфицирующим раствором (1,25% раствор велтолена) и промыть с помощью промывочного устройства или многоканальной пипетки, добавляя во все лунки по 350 мкл рабочего промывочного раствора (см. п. 7.3). Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Общее число промывок равно 5. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Раствор из лунок тщательно удалить, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.11. В каждую лунку стрипа, кроме А-1, внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.6). В лунку А-1 внести 100 мкл РРК. Планшет заклеить плёнкой и инкубировать 30 мин при 37 ± 1 °С.

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

7.12. По окончании инкубации содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть, как описано в п. 7.10.

7.13. Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см. п. 7.7).

Планшет инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С. Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре

вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом, положительным контрольным образцом и раствором для разведения сывороток.

9.2. Значение оптической плотности в лунках с раствором для разведения сывороток не должно превышать 0,10 ед. опт. плотн.

Среднее значение ОП в лунках с K^- не должно превышать 0,20 ед. опт. пл. при использовании двухволнового режима измерения и не превышать 0,25 ед. опт. пл. при измерении на одной длине волны.

Среднее значение ОП в лунках с K^+ должно быть не менее 0,80 ед. опт. пл.

9.3. Только при соблюдении положений п. 9.2 можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.4. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$).

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} K^+ + 0,2$$

9.5. Результат анализа считается отрицательным, если значение ОП в соответствующей лунке ниже $ОП_{крит}$.

Результат анализа читается положительным, если значение ОП в соответствующей лунке равно или превышает $ОП_{крит}$.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут.

10.2. Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (9 мес). Замораживание не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение 1 мес. В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес;

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор, раствор для предварительного разведения сывороток, концентрат тетраметилбензидина и стон-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

–положительный и отрицательный контрольные образцы, концентрат конъюгата, раствор для разведения конъюгата и раствор для разведения сывороток после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес;

– рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток;

– рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25°С не более 3 ч;

– рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч.

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

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

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

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 227-75-43, тел./факс (383), 336-60-30,

и в **Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора** по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495) 120-60-95; 120-60-96.

Научный сотрудник лаборатории
герпес-вирусных инфекций
ЗАО «Вектор-Бест»

О.В. Олейник

Генеральный директор
ЗАО «Вымпел-Медцентр»



С.П. Кондрашов