

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 201__ г.
№ _____

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального директора
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические системы»



О.Н.Шлюндин

2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-АНТИ-ВЭБ-VCA-G-АВИДНОСТЬ»

Тест-система иммуноферментная
для определения индекса авидности антител класса IgG
к капсидному антигену (VCA) вируса Эпштейна-Барр,
набор диагностический

Содержание

I. Назначение.....	3
II. Состав набора	3
III. Аналитические и диагностические характеристики набора.....	4
IV. Меры предосторожности.....	4
V. Инструкции по безопасности.....	5
VI. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемые с набором реагентов.....	5
VII. Отбор и подготовка образцов.....	6
VIII. Подготовка реагентов.....	6
IX. Проведение анализа.....	7
X. Учет результатов.....	8
XI. Срок годности. Условия хранения и транспортирования.....	9
XII. Объяснение символов	9

Набор реагентов выпускается в одном комплекте:

Набор рассчитан на проведение 48 определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного использования набора.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-ВЭБ-VCA-G-АВИДНОСТЬ» - тест-система иммуноферментная для определения индекса авидности антител класса IgG к капсидному антигену (VCA) вируса Эпштейна-Барр в сыворотке (плазме) крови человека с целью специфической диагностики первичной инфекции.

II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-АНТИ-ВЭБ-VCA-G-АВИДНОСТЬ»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки), в лунках которого сорбированы рекомбинантные капсидные антигены вируса Эпштейна-Барр.	1 планшет
Конъюгат (концентрат x 21) – моноклональные антитела мыши против иммуноглобулина G человека, меченные пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 1,0 мл
K ₁ + (контрольный положительный высокоавидный образец) - сыворотка крови человека, содержащая высокоавидные антитела класса IgG к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
K ₂ + (контрольный положительный низкоавидный образец) - сыворотка крови человека, содержащая низкоавидные антитела класса IgG к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая оранжевого цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
K- (контрольный отрицательный образец) - сыворотка крови человека, не содержащая антитела к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 3,0 мл
РРК - раствор для разведения конъюгата - при температуре от 2 до 8 °С – прозрачная жидкость желтого цвета, при температуре от 18 до 24 °С становится опалесцирующей.	1 флакон 13,5 мл
БР – блок-раствор - для разведения исследуемых образцов. Прозрачная или слегка опалесцирующая сине-фиолетового цвета жидкость.	1 флакон 12,5 мл
РД - раствор денатурирующий. Прозрачная сиреневого цвета жидкость.	1 флакон 7,0 мл
РС - раствор сравнения. Прозрачная зелено-голубого цвета жидкость.	1 флакон 7,0 мл
ПР - промывочный раствор (концентрат x 25). Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании.	1 флакон 50,0 мл
СБ - субстратный буферный раствор, содержащий лимонную кислоту, ацетат натрия, раствор перекиси водорода. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 15,0 мл
ТМБ - раствор, содержащий 3,3',5,5'- тетраметилбензидиндегидрохлорид. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 1,5 мл
Стоп-реагент - раствор серной кислоты 0,75 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами.
Реагенты помещают в коробку картонную, куда вкладывают инструкцию по применению.

Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетами или защитная пленка для ИФА планшетов	1 шт. 2 шт.
	Одноразовые наконечники	16 шт.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.
	Полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или пластиковая скрепка	1 шт.

III. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Оценка диагностической эффективности теста проводилась на внутренней панели предприятия, состоящей из образцов, содержащих высокоавидные и низкоавидные антитела к вирусу Эпштейна-Барр, и составила 100%.

IV. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с температурой от 18 до 24 °С.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме реагентов, входящих в состав тест-систем для диагностики ToRCH-инфекций:

- неспецифических компонентов (ПР (концентрат x 25), СБ), которые взаимозаменяемы во всех тест-системах производства ООО «НПО «Диагностические системы»;

- стоп-реагента, который может быть взаимозаменяемым в зависимости от молярности раствора (0,75 моль/л или 0,2 моль/л).

Внимание! Молярность стоп-реагента указана в разделе «Состав набора».

Другие реагенты также могут быть взаимозаменяемыми для постановки в большинстве тест-систем производства ООО «НПО «Диагностические системы». За более детальной информацией обратитесь в нашу службу поддержки пользователей по телефону бесплатной линии 8-800-555-0300 (доб 7606, 7655) или по E-mail: info@npods.nnov.ru


- Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Перед использованием все реагенты набора выдержать при температуре от 18 до 24 °С в течение 30 мин.
- Растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.
- Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной. Многоцветные ванночки для автоматических анализаторов необходимо сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной. Затем промыть 70 % раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной.
- Иммуносорбент допускается хранить в промежутках между отдельными операциями не более 10 мин (нельзя допускать высыхания лунок планшета).
- Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстрата.
- Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.
- Промывка лунок - важный этап в данной процедуре: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполняются, не допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.
- Нельзя использовать одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и растворов.
- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование.

- Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

V. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении К-, были протестированы и определены нереактивными в отношении антител класса IgG к капсидному антигену (VCA) вируса Эпштейна-Барр, поверхностного антигена вируса гепатита В, антител к вирусу гепатита С и вирусу иммунодефицита человека ВИЧ-1,2.
 - Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении К₁+, К₂+, были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В, антител к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
 - Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
 - При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами.
 - При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спец. одежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
 - Необходимо избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы. При распыливании немедленно дезактивировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.
 - Необходимо избегать контакта субстратного буфера, ТМБ, стоп-реагента с кожей и слизистыми.
 - После проведения ферментной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дез. средства. Твёрдые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.



-  xi Некоторые реагенты содержат 0,05 % проклин 300. Проклин 300 0,05 % - раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

VI. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Вода дистиллированная.
- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или предварительно устанавливаемые одноканальные или многоканальные пипетки с изменяемым объемом для отбора жидкостей.
 - Одноразовые наконечники к пипеткам.
 - Инкубатор микропланшетный (37,0 ± 0,5) °С.

- Автоматический микропланшетный вошер.
- Градуированные цилиндры: 25 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Микропланшетный ридер с возможностью измерения оптической плотности (ОП) при фильтрах 450 нм и 620-680 нм.

VII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы **термоинактивированию**, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. **Каждый образец сыворотки следует отбирать новым наконечником!** Отобранные образцы хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Образцы с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией могут дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо «осветлять» центрифугированием.

VIII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:

- **К-** - контрольный отрицательный образец;
- **К₁+** - контрольный высокоavidный положительный образец;
- **К₂+** - контрольный низкоavidный положительный образец;
- **РРК** - раствор для разведения конъюгата;
- **БР** - блокирующий раствор для разведения исследуемых образцов;
- **РД** - раствор денатурирующий;
- **РС** - раствор сравнения;
- **Стоп-реагент.**

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

Иммуносорбент. Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет и вынуть планшет. Взять необходимое количество стрипов. Неиспользованные стрипы без рамки поместить обратно в фольгированный пакет (не удаляя силикагель!) и тщательно герметизировать. Для этого поместить вскрытый пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или край фольгированного пакета свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета. После вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 6 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

Рабочий промывочный раствор (ПР). Содержимое флакона с концентратом (концентрат х 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимый объем концентрата промывочного раствора развести соответствующим объемом воды дистиллированной (см. табл. 2). Полученный раствор тщательно перемешать. Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут. при температуре от 18 до 24 °С или 28 сут. при температуре от 2 до 8 °С.

Рабочий раствор конъюгата. Необходимое количество РРК перенести в чистый флакон, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата (концентрат х 21) (см. табл. 2) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Хранить не более 12 часов в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С в чистых флаконах.

Субстратная смесь (СС). Развести необходимый объем ТМБ соответствующим объемом СБ (см. табл. 2). Тщательно перемешать до полного растворения. Субстратную смесь готовить перед использованием. Хранить не более 10 ч в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С в чистых флаконах.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

После вскрытия флаконов и пакета с иммуносорбентом оставшиеся не использованными реагенты: иммуносорбент - хранить не более 6 мес., конъюгат (концентрат х 21), контрольный положительный высокоавидный образец (K₁+), контрольный положительный низкоавидный образец (K₂+), контрольный отрицательный образец (K-), РРК, БР, РД, РС, ПР (концентрат х 25), СБ, ТМБ, стоп-реагент хранить во флаконах, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

IX. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при температуре от 18 до 24 °С.

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблице 2.

Таблица 2

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор (ПР)		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц. х 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. х 21) (мл)	РРК (мл)	СБ (мл)	ТМБ (мл)
2	8	192	0,1	2,0	2,0	0,1
4	16	384	0,2	4,0	4,0	0,2
6	24	576	0,3	6,0	6,0	0,3
8	32	768	0,4	8,0	8,0	0,4
10	40	960	0,5	10,0	10,0	0,5
12	48	1152	0,6	12,0	12,0	0,6

1. Перед использованием планшет промыть 2 раза рабочим ПР: осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета с помощью промывочного устройства до краёв лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 с, затем удалить промывочный раствор в ёмкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использование автоматического микропланшетного вошера. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.

2. Контрольные образцы вносить одновременно по 100 мкл в лунки двух параллельных стрипов иммуносорбента. Например, в 2 лунки А-1 и А-2 дозатором пипеточным внести по 100 мкл K₁+, в 2 лунки В-1, В-2 - по 100 мкл K₂+, в 2 лунки С-1 и С-2 по 100 мкл К-. В остальные лунки иммуносорбента внести по 90 мкл блок-раствора, затем попарно в соседние лунки двух стрипов внести по 10 мкл образцов исследуемых сывороток (разведение сывороток 1:10).

3. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием, при этом фиолетово-синий цвет должен измениться на голубовато-зеленый. Если изменение цвета не произошло, значит, сыворотка не внесена. Стрипы закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать 30 мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

4. Содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дез. раствором, с помощью промывочного устройства, планшет промыть 4 раза рабочим ПР, используя автоматический микропланшетный вошер, как указано в п 1.

5. В лунки нечетных стрипов внести по 100 мкл РС. В лунки четных стрипов - по 100 мкл РД. Стрипы выдержать 10 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

6. Содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дез. раствором, с помощью промывочного устройства, планшет промыть 2 раза рабочим ПР, используя автоматический микропланшетный вошер, как указано в п 1.

7. Во все лунки стрипов внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в течение 30 мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

8. Содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дез. раствором, с помощью промывочного устройства, планшет промыть 4 раза рабочим ПР, используя автоматический микропланшетный вошер, как указано в п 1.

9. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл СС и планшет выдержать в течение 20 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

10. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 50 мкл стоп-реагента и через 3-4 минуты провести учет результатов при основном фильтре 450 нм и референс-фильтре 620-680 нм, используя ридер. Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм.

Х.УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реакцию следует учитывать, если средние значения оптической плотности (ОП) в лунках с К+ не ниже 0,6, а среднее значение К- не более 0,150.

Индекс авидности рассчитывать по формуле:

$$\text{Индекс авидности} = \frac{\text{ОПисслед. образца (реакция с РД)}}{\text{ОПисслед. образца (реакция с РС)}} \times 100 \%$$

Полученные результаты достоверны, если индекс авидности K_1+ не менее 70 %, а индекс авидности K_2+ не более 50 %. Если индекс авидности исследуемой положительной сыворотки менее 50 %, то сыворотка содержит низкоавидные антитела, что указывает на первичную инфекцию. Если индекс авидности равен либо превышает 50 %, то сыворотка содержит высокоавидные антитела, что указывает на давнюю инфекцию.

Внимание! Расчет индекса авидности возможен лишь для сывороток, предварительно исследованных с помощью тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-ВЭБ-VCA-G» и показавших положительный результат на наличие анти-VЭБ-VCA-G.

Интерпретация результатов

Результаты постановки тест-системы оценивают с помощью таблицы 3. Однако для более точной постановки диагноза необходимо также руководствоваться клиническими данными.

Таблица 3

Интерпретация результатов постановки тест-системы

	Низкоавидные антитела	VCA-IgG*	VCA-IgM	EA-IgG	NA-IgG
Инкубационный период или отсутствие инфицирования	-	-	-	-	-
Первичная инфекция	+	+	+/-	-	-
Острая первичная инфекция (инфекционный мононуклеоз)	+	+	+	+	-
Поздняя первичная инфекция	-	+	+/- ($\leq 0,3$)	+	+/-
Атипичная первичная инфекция	-	+	+	-	-
Хроническая инфекция	-	+	+/-	+	-
Ранняя паст-инфекция (реконвалесценция)	-	+	-	+	+
Поздняя паст-инфекция (латентная инфекция у клинически здоровых людей)	-	+	-	-	+
Реактивация	-	+	+	+	+

* у детей до 7-8- лет IgG к VCA могут не выявляться

XI. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ






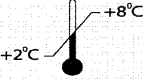


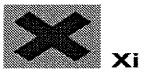
Срок годности - 24 месяца. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Хранение - в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование - при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование от 9 до 20 °С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 603093, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.ru, www.npods.ru.

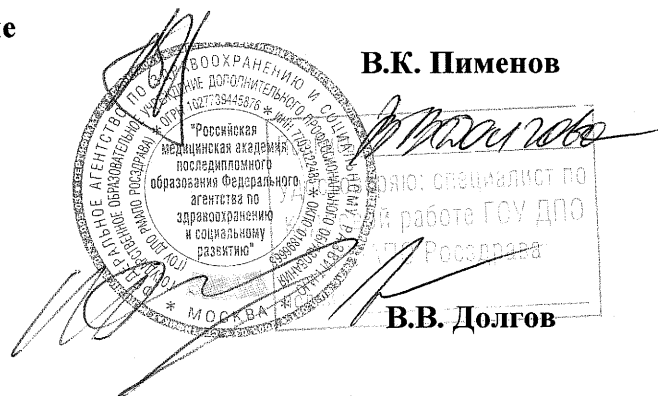
XII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Номер партии (серии)
	Количество определений
	Каталожный номер
	Температурные пределы хранения
	Используйте инструкцию по применению
	Срок годности дата/месяц/год
	Содержит раздражающее вещество

Директор по производству
ООО «Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»

СОГЛАСОВАНО
Зав.кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»
д.м.н, профессор

В.К. Пименов



В.В. Долгов