«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«26» сентября 2022 г.
м.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к капсидным антигенам VCA вируса Эпштейна-Барр в сыворотке (плазме) крови
(ВектоВЭБ-VCA-IgG)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к капсидным антигенам VCA вируса Эпштейна-Барр в сыворотке (плазме) крови (ВектоВЭБ-VCA-IgG) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к капсидным антигенам VCA вируса Эпштейна-Барр в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на непрямом твердофазном иммуноферментном анализе. Специфическим реагентом набора являются рекомбинантные антигены VCA ВЭБ, сорбированные на поверхности лунок полистиролового планшета. На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках стрипов с иммобилизованными рекомбинантными антигенами VCA ВЭБ. Специфические антитела к VCA ВЭБ связываются с иммобилизованными рекомбинантными антигенами, формируя комплекс «антиген-антитело». На второй стадии, связавшиеся антитела взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител против IgG человека с пероксидазой хрена. Комплекс «антиген–антитело–конъюгат» выявляется цветной реакцией с использованием раствора тетраметилбензидина. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце IgG к VCA ВЭБ.

Измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–655 нм, допускается измерение только при длине волны 450 нм.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок рекомбинантными антигенами VCA ВЭБ, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, содержащий IgG к VCA ВЭБ, ($К^+$), инактивированный, готовый для использования – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец, не содержащий IgG к VCA ВЭБ, ($К^-$), инактивированный, готовый для использования – 1 фл., 3,0 мл;
- конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 фл., 10 мл;
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 фл., 12,0 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 фл. по 28 мл;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
– стоп-реагент, готовый для использования – 1 фл., 12 мл.

Принадлежности:

– пленки для заклеивания планшета – 2 шт.;
– ванночки для реагентов – 2 шт.;
– наконечники для дозаторов на 2–200 мкл – 16 шт.;
– планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления IgG к VCA ВЭБ – соответствие результатов определения набором IgG к VCA ВЭБ требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-261), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: значения оптической плотности в лунках с положительными образцами СПП больше $ОП_{крит}$.

3.2. Специфичность выявления IgG к VCA ВЭБ – соответствие результатов определения набором IgG к VCA ВЭБ требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-261), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: значения оптической плотности в лунках с отрицательными образцами СПП меньше $0{,}8 \times ОП_{крит}$.

3.3. Диагностическая чувствительность выяв-ления иммуноглобулинов класса G к капсидным антигенам VCA вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ): клинические испытания, проведенные на 184 положительных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 132 пациентов, показали 100 % чувствительность (интер-вал 97,8%–100%, с доверительной вероятностью 90%);

3.4. Диагностическая специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к капсидным антигенам VCA вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ): клинические испытания, проведенные на 184 отрицательных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 134 пациентов, показали 100 % специфичность (интервал 97,8%–100%, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2, деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру 37±1°С;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5–5000 мкл;
- дозаторы полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей 5–300 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 100 и 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия или ЭДТА.

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

6.3. 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. Следует избегать многократного замораживания/оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

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

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты и анализируемые образцы при температуре от 18 до 25°С не менее 60 мин.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°С в течение срока годности набора.

7.2. 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°С в течение всего срока годности набора.

7.3. 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 набора реагентов) 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

40°С до полного растворения осадка.

Хранение: при температуре от 2 до 8°С не более 5 сут.

7.4. Подготовка контрольных образцов

Контрольные образцы готовы к использованию. Перед использованием встряхнуть.

7.5. 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 (плазмы), тщательно перемешать. При разведении сыворотки красный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

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

7.6. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки после проведения ИФА утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным конъюгатом)***.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина

Раствор ТМБ готов к использованию.

Исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) 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.

7.8. Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внесение контрольных и исследуемых образцов

В две лунки стрипа, например, в А-1 и В-1, внести по 100 мкл $К^-$; в одну лунку, например, С-1, 100 мкл $К^+$. В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (см. п. 7.5), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

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

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

8.2. 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. 7.3), 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 цикла промывки. По окончании промывки остатки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата.

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

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

8.4. По окончании инкубации лунки планшета промыть, как описано в п. 8.2.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ.

Для внесения раствора ТМБ использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

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

8.7. 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 620–655 нм; или при длине волны 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср}К^-$).

Среднее значение ОП в лунках с $К^-$ не должно превышать 0,25 ед. опт. пл..

Значение ОП в лунке с $К^+$ должно быть не менее 0,80 ед. опт. пл.

Только в случае соблюдения указанных условий можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.2. Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит.}$).

$$\mathbf{ОП_{крит.} = ОП_{ср.}\ К^- + 0{,}1}$$

9.3. Результат анализа **положительный**, если $ОП_{обр.} > ОП_{крит.}$

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

где $ОП_{обр.}$ – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом.

Результат анализа **неопределенный**, если $ОП_{обр.}$ попадает в интервал $0{,}8 \times ОП_{крит.} \leq ОП_{обр.} \leq ОП_{крит.}$ В случае неопределенного результата рекомендуется повторно исследовать эти образцы параллельно с сыворотками данных больных, взятыми через 10–15 дней.

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

Для расчета коэффициента позитивности образцов использовать следующую формулу:

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

Результат анализа **положительный**, если $КП_{обр.} > 1{,}0$, где $КП_{обр.}$ – коэффициент позитивности исследуемого образца.

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

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 в исследуемых образцах и при наблюдении за изменением концентрации IgG к VCA ВЭБ в динамике в парных образцах сывороток (плазмы).

9.5. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации IgG к VCA ВЭБ в сыворотке (плазме) крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток.

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

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности набора. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор ТМБ и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора;
- контрольные образцы и конъюгат после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора;
- промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 суток.

10.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор ТМБ), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

11.3. 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 «ВектоВЭБ-VCA-IgG»
следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область,
р.п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64, (383) 363-57-95.
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

Антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют.

1. Обеспечение получения правильных результатов анализа

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

– 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 ТМБ;

– 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 протереть конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона;

– 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.

Для получения правильного рабочего разведения исследуемых сывороток необходимо:

а) при отборе 10 мкл сыворотки для предварительного разведения не погружать наконечник 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Оценка анализа по коэффициенту позитивности

В случае необходимости оценки результатов по коэффициенту позитивности для образцов с оптической плотностью, превышающей **3,5 о.е,** полученной в двухволновом режиме **450 / 620–655 нм** (или только с фильтром **450 нм**), необходимо провести повторное измерение ОП в режиме: основной фильтр – **405 нм**, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение без использования референс-фильтра. Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих **$ОП_{450}$ > 3,5 о.е**., использовать формулу:

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

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

Результат анализа **положительный**, если $КП_{обр.} > 1{,}0$, где $КП_{обр.}$ – коэффициент позитивности исследуемого образца.

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

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

3. Диагностика ВЭБ-инфекции

Открытый в 60-х годах вирус герпеса человека 4 типа (ВГЧ-4) или вирус Эпштей-на-Барр (ВЭБ) относится к подсемейству Gammaherpesvirinae рода Gymphocryptovirus. ВЭБ поражает в основном два типа клеток: эпителий верхних дыхательных путей и пищеварительного тракта, а также В-лимфоциты, которые в результате инфицирования иммортализуются. Соответственно, ВЭБ вызывает такие различные заболевания, как инфекционный мононуклеоз, злокачественная лимфома Беркитта, злокачественная носоглоточная карцинома.

Вирус Эпштейна-Барр широко распространен в человеческой популяции. Как показали эпидемиологические исследования, инфицированность ВЭБ детей в возрасте до 5 лет в России составляет до 50%, а взрослых – 95%.

Источником ВЭБ является больной человек или здоровый носитель. Вирус выделяется со слюной в продромальном периоде, в разгаре заболевания и при выздоровлении в период до 6 мес.

Заражение здорового человека ВЭБ может осуществляться воздушно-капельным, контактно-бытовым и половым путями. Установлено, что он может передаваться при переливании донорской крови и других парентеральных вмешательствах.

У людей без дефектов иммунной системы первичное инфицирование ВЭБ может протекать бессимптомно или вызывать субклинические проявления болезни с положительными серологическими реакциями. В дальнейшем вирус может длительное время персистировать в клетках хозяина в виде латентной инфекции. При массированном поступлении вируса или недостаточности иммунной системы развивается вирусемия, приводящая к острым формам заболевания.

В процессе репликации вируса экспрессируется свыше 70 различных вирусоспецифических белков, однако к настоящему времени выделены группы иммуногенных белков, определение антител к которым дает возможность дифференцировать стадию инфекции.

Наиболее специфичными и чувствительными маркерами ВЭБ-инфекции являются IgG и IgM к капсидному антигену (VCA), IgG к раннему антигену (EA) и IgG к ядерному антигену (NA).

На рисунке приведены в общем виде серологические профили наличия антител к различным белкам ВЭБ при типичном течении инфекции.

Активная фаза инфекционного мононуклеоза характеризуется продукцией у больного IgM и IgG к VCA и, в большинстве случаев, наличием IgG и IgM, специфичных к комплексу ранних антигенов. На ранней стадии первичной инфекции IgG к VCA характеризуются низким индексом авидности (ИА). В течение нескольких недель происходит созревание антител и возрастание ИА. На стадии паст-инфекции в сыворотках крови пациентов выявляются уже высокоавидные IgG к VCA.

IgM к VCA появляются в крови у 87–100% больных в первые недели заболевания и определяются в течение 1–3 месяцев. IgG к VCA появляются немного позднее. Их концентрация достигает максимального значения также на первых стадиях заболевания, а затем снижается, но обычно

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

остается на стабильно детектируемом уровне всю жизнь.

IgG к NA начинают детектироваться в крови инфицированных только через 1–6 месяцев. Их концентрация обычно сохраняется на достаточно высоком уровне пожизненно.

IgG к EA обнаруживаются у 70–80% больных в сроки от нескольких недель до года после инфицирования. При реактивации инфекции вновь происходит сероконверсия антител (начинают определяться IgM к VCA и IgG к EA). При этом концентрация антител в крови быстро достигает высоких значений. Следует подчеркнуть, что, как правило, это происходит при наличии у больного высоких титров IgG к NA.

Таким образом, определение IgG к антигенам EBNA и EA, определение IgG и IgM к VCA и определение индекса авидности IgG к VCA дает необходимую и достаточную информацию для постановки диагноза и установления стадии инфекции.

АО «Вектор-Бест» предлагает наборы реагентов для серологической диагностики ВЭБ-инфекции – «ВектоВЭБ-NA-IgG» (D-2170) для выявления IgG к ядерному антигену ВЭБ, «ВектоВЭБ-EA-IgG» (D-2172) для выявления IgG к раннему антигену ВЭБ, «Векто-ВЭБ-VCA-IgG» (D-2184) и «ВектоВЭБ-VCA-IgM» (D-2176) для выявления IgG и IgM к капсидному антигену ВЭБ, а также «ВектоВЭБ-VCA-IgG-авидность» (D-2183) для определения индекса авидности IgG к VCA.

Комплекс этих пяти наборов реагентов позволяет с высокой эффективностью по данным серологических исследований диагностировать различные стадии ВЭБ инфекции. В таблице 2 приведена возможная интерпретация результатов серологических исследований (литературные данные).

4. Список использованной литературы:

1. Rickinson A., Kieff E. Epstein-Barr virus // Kieff E. (ed.).Fields Virology. New York: Lippincott-Raven, 1996.V. 2. P. 2397–2446.
2. Дранкин Д.И., Заяц Н.А. Эпидемиология инфекционного мононуклеоза. // ЖМЭИ. 1982. №1. С. 26–32.
3. Henle W., Henle G., Harrison F. et al. // N. Engl. I. Med.1968. V. 282. P. 1068–1071.
4. Henle G., Henle W. // Epstein M.A., Achong B.G. (eds).The Epstein-Barr Virus. Berlin: Springer-Verlag, 1979.P. 61–73.
5. Khanna R., Burrows S.R., Moss D. // Microbiol. Rev.1995. V. 59. P. 387–405.
6. Тихомиров Д.С. Лабораторная диагностика герпес-вирусных инфекций у гематологических больных: Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 2009. 28 с.
7. Hess R.D. // J. Clin. Microbiol. 2004. V. 42. P. 3381–3387.
8. Данилюк Н.К. // Новости «Вектор-Бест». 2000. № 4 (18). С. 10–13.
9. Mayer J., Schwarzmann F., Reischl U. and Wolf H. // Biotest Bulletin. 1993. V.5. P.3-12.

5. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов реагентов «ВектоВЭБ-VCA-IgG»

Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!

Внести: по 100 мкл $К^+$ и $К^-$;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов.

Инкубировать: 30 мин, 37°С.

Промыть: промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл конъюгата.

Инкубировать: 30 мин, 37°С.

Промыть: промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

Инкубировать: 25 мин, 18–25°С, в темноте.

Внести: по 100 мкл стоп-реагента.

Измерить: ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Графические символы

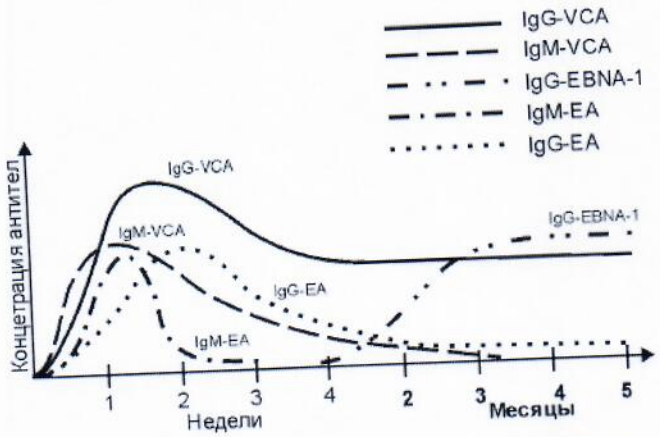
REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ/n	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до …		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 363-57-95

Таблица 1

Расход компонентов набора реагентов

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



Рисунок

EA	(early antigen) – ранний антиген
EBN	(Epstein-Barr nuclear antigen) – ядерный антиген.
VCA	(Viral capsid antigen) – капсидный антиген.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 2.

Интерпретация результатов комплексного серологического тестирования при ВЭБ-инфекции

Фаза инфекции	Анти-VCA IgM	Анти-VCA IgG	Наличие низкоавидных VCA-IgG	Анти-EA-IgG	Анти-EBNA-1-IgG
Инкубационный период или отсутствие инфицирования	–	–	Не определяют	–	–
Очень ранняя первичная инфекция	+	–	Не определяют	–	–
Ранняя первичная инфекция	+	+	+	+	–
Поздняя первичная инфекция	±	+	±	+	±
Атипичная первичная инфекция	–	+	±	+	±
Реактивация	+	+	–	+	+
Ранняя паст-инфекция	–	+	±	+	+
Поздняя паст-инфекция	–	+	–	–	+
Поздняя паст-инфекция, иммуносупрессия	–	+	–	–	–
Хроническая инфекция	±	+	–	+	±
Атипичная реактивация	–	+	–	+	+

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru