

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «Биотехлит»

В.М. Говорун

2007 г.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ 200 г. № _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

набора реагентов для выявления антител классов IgG и/или IgM

к вирусу простого герпеса 2-го типа в сыворотке крови

методом иммуноферментного анализа

(ВПГ-2 IgG/IgM)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВПГ-2 IgG/IgM предназначен для качественного выявления антител класса IgG и/или IgM к вирусу простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа.

1.2. Набор предназначен только для применения *in vitro*.

1.3. Набор реагентов рассчитан на проведение 96 определений, включая контрольные образцы.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

2.1. Метод основан на связывании антител, присутствующих в анализируемом образце, с вирусным антигеном (gG-2), сорбированном на поверхности лунок планшета. С образовавшимся иммунным комплексом связывается конъюгат (антитела к IgG или IgM человека, конъюгированные с ферментом - пероксидазой хрена). Далее, после добавления субстрата и хромогена (ТМБ), в ходе ферментативной реакции происходит конверсия окраски ТМБ – раствор приобретает синий цвет, а после остановки реакции стоп-реагентом – желтый. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию антител к ВПГ-2 в анализируемом образце.

3. СОСТАВ НАБОРА

Набор выпускается в трёх комплектациях.

Комплектация №1, позволяющая осуществлять выявление антител классов IgG и IgM, включает:

- 96-луночный стрипованный планшет с отламывающимися лунками, на поверхности которых сорбирован антиген gG-2 ВПГ-2, готов к использованию - 1 шт;
- раствор для разведения сыворотки на основе фосфатного буфера, готов к использованию - 1 флакон (15 мл);
- отмывочный раствор, 20-кратный концентрат (150 мМ натрия хлорид; 10 мМ трис; 0,05 % Твин-20), pH 7,2-7,4 - 1 флакон (50 мл),
- положительная IgG контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека, содержащая антитела IgG к ВПГ-2 (К+), готова к использованию - 1 пробирка (0,15 мл);
- положительная IgM контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека, содержащая антитела IgM к ВПГ-2 (К+), готова к использованию - 1 пробирка (0,15 мл);
- cut-off IgG контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека, содержащая известное количество антител IgG к ВПГ-2, готова к использованию - 1 пробирка (0,15 мл);
- cut-off IgM контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека, содержащая известное количество антител IgM к ВПГ-2, готова к использованию - 1 пробирка (0,15 мл);
- отрицательная IgG контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека, не содержащая антитела IgG к ВПГ-2 (К-), готова к использованию - 1 пробирка (0,15 мл);
- отрицательная IgM контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека, не содержащая антитела IgM к ВПГ-2 (К-), готова к использованию - 1 пробирка (0,15 мл);
- конъюгат IgG (козьи поликлональные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой), готов к использованию - 1 флакон (13 мл);
- конъюгат IgM (козьи поликлональные антитела к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой), готов к использованию - 1 флакон (13 мл);
- раствор тетраметилбензидина (ТМБ) в диметилформамиде, 11-кратный концентрат - 1 флакон (1,5 мл);
- субстратный буфер (лимонная кислота, 15 г; натрия цитрат, 30 г; перекись водорода, 0,3 мл), pH 4,8 - 1 флакон (15 мл);
- сорбент (козьи поликлональные антитела к IgG человека), готов к использованию - 1 пробирка (1,1 мл);
- стоп-реагент (1 М серная кислота), готов к использованию - 1 флакон (15 мл);
- плёнка для заклеивания планшета - 2 шт.

Комплектация № 2, позволяющая осуществлять выявление антител только класса IgG, включает все компоненты комплектации № 1, за исключением положительной IgM контрольной сыворотки, cut-off IgM контрольной сыворотки, отрицательной IgM контрольной сыворотки, конъюгата IgM и сорбента.

Комплектация № 3, позволяющая осуществлять выявление антител только класса IgM, включает все компоненты комплектации № 1, за исключением положительной IgG контрольной сыворотки, cut-off IgG контрольной сыворотки, отрицательной IgG контрольной сыворотки и конъюгата IgG. Содержит сорбент в количестве 2 пробирок (по 1,1 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. Значение оптической плотности (ОП) положительной контрольной сыворотки – более 0,9. Значение оптической плотности (ОП) отрицательной контрольной сыворотки – менее 0,35.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. Стоп-реагент (серная кислота) действует на кожу и слизистые прижигающим образом, вызывая раздражение и ожоги, поэтому в случае попадания на кожные или слизистые покровы её следует немедленно и тщательно смыть большим количеством проточной воды.

5.4. Тетраметилбензидин (ТМБ), субстратный буфер и рабочий раствор ТМБ чувствительны к воздействию солнечного света; необходимо исключить также их контакт с окислителями и металлами.

5.5. 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.).

5.6. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. несмотря на то, что лунки микропланшета покрыты инактивированным антигеном gG-2 ВПГ-2, а контрольные сыворотки в наборах являются отрицательными на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В (HbsAg), антител к вирусу гепатита С и вирусу иммунодефицита человека, их, также как и анализируемые образцы крови человека, следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита и другие возбудители вирусных инфекций.

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

- Фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;

- термостат или планшетный шейкер-термостат, позволяющие поддерживать температуру $+37^{\circ}\text{C}$;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 30 - 200 мкл и 200 – 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 100-300 мкл;
- мерная посуда вместимостью 100 и 1000 мл;
- секундомер;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- вода дистиллированная.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка крови человека.

До проведения анализа возможно хранение образцов сыворотки крови при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 2 дней или при температуре -20°C не более 3 месяцев. Допускается только однократное замораживание и размораживание образцов сыворотки крови. Пробы, содержащие агрегаты или осадок, осветляют центрифугированием. Каждый образец отбирается индивидуальным наконечником. Гиперлипидные или гемолизированные образцы сыворотки кровитестированию не подлежат.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

8.1. Приготовление рабочего отмывочного раствора.

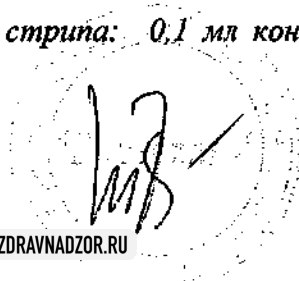
Концентрат отмывочного раствора развести дистиллированной водой в 20 раз. Срок хранения рабочего отмывочного раствора при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ - не более 1 месяца.

Для анализа одного стрипа: 4 мл концентрата довести до 80 мл дистиллированной водой.

8.2. Приготовление рабочего раствора субстрата.

Концентрат ТМБ развести субстратным буфером в 11 раз. (ВНИМАНИЕ: при разведении необходимо к субстратному буферу добавить ТМБ, а не наоборот). Готовится непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.

Для анализа одного стрипа: 0,1 мл концентрата ТМБ смешать с 1,0 мл субстратного буфера.



9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Выдержать компоненты набора и анализируемые образцы сыворотки крови при комнатной температуре + (18 – 25) °C в течение времени не менее 30 мин. *Пакет с планшетом не открывать!*

9.2. Встряхнуть все компоненты набора.

9.3. Извлечь планшет из пакета. Определить необходимое количество лунок (количество анализируемых проб + 4 лунки для контролей). Неиспользованные стрипы поместить обратно в пакет и плотно закрыть на zip-lock защелку (пакетик с поглотителем влаги должен оставаться внутри).

9.4. Для определения IgG антител: внести по 100 мкл раствора для разведения сывороток во все лунки. Далее добавить по 5 мкл каждого образца и каждой из контрольных сывороток (cut-off – в дубле) в соответствующие лунки, перемешивая пипетированием несколько раз.

9.5. Для определения IgM антител: внести по 25 мкл сорбента во все лунки, за исключением 4 лунок, предназначенных для контролей. Далее в лунки с сорбентом добавить по 5 мкл каждого образца, перемешивая пипетированием несколько раз, и добавить по 75 мкл раствора для разведения сывороток в лунки с тестируемыми образцами. В лунки, предназначенные для контролей, внести по 100 мкл раствора для разведения сывороток и по 5 мкл каждой из контрольных сывороток (cut-off – в дубле), перемешивая пипетированием несколько раз.

9.6. Заклеить планшет липкой лентой и инкубировать при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 45 мин.

9.7. Удалить жидкость из лунок и промыть 5 раз рабочим отмывочным раствором (см п. 8.1), внося в каждую лунку по 300 мкл. Удалить остатки отмывочного раствора из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

9.8. Внести по 100 мкл конъюгата IgG или конъюгата IgM во все лунки.

9.9. Инкубировать при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 мин.

9.10. Удалить жидкость из лунок и отмыть 5 раз рабочим отмывочным раствором, внося в каждую лунку по 300 мкл. Удалить остатки отмывочного раствора из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

9.11. Внести по 100 мкл рабочего раствора субстрата (см п. 8.2) во все лунки.

9.12. Заклеить планшет липкой лентой, осторожно перемешать содержимое лунок круговыми движениями планшета по поверхности стола и инкубировать при комнатной температуре + (18 – 25) °С в течение 20-25 мин в зависимости от степени развития окраски в защищенном от света месте.

9.13. Внести по 100 мкл стоп-реагента во все лунки для остановки реакции. *Соблюдать ту же последовательность добавления реагента, что и при внесении рабочего раствора субстрата.*

9.14. Провести измерение оптической плотности на фотометре при длине волны 450 нм. Процедура измерения не должна превышать 15 минут после остановки реакции (до измерения хранить планшет в защищенном от света месте).

10. УЧЕТ И ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1. Контроль качества постановки анализа

Оптическая плотность (ОП) контрольных сывороток должна находиться в следующих интервалах:

<i>Контрольная сыворотка</i>	<i>ОП</i>
К+	> 0,9
К- (IgG, IgM)	< 0,3
К cut-off (IgG, IgM)	< 0,7 x (ОП К+) > 1,5 x (ОП К-)

10.2. Интерпретация результатов

Рассчитать Индекс антител = (ОП образца / среднее значение ОП К cut-off)

<i>Индекс</i>	<i>Результат</i>
< 0,9	Отрицательный
0,9 – 1,1	Серая зона
> 1,1	Положительный

10.3. Образцы с индексом ниже 0,9 оцениваются как не содержащие антител класса IgG или IgM к вирусу простого герпеса 2 типа.

10.4. Образцы с индексом более 1,1 оцениваются как содержащие антитела класса IgG или IgM к вирусу простого герпеса 2 типа.

10.5. При попадании образца в «серую зону» (индекс антител = 0,9 – 1,1) результат считается неопределенным. В этом случае рекомендуется повторить исследование сыворотки крови на содержание антител к ВПГ-2 в динамике через 1-2 недели после первого забора крови.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

11.1. Набор реагентов ВПГ-2 IgG/IgM должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя в сухом месте при температуре +2–8 °С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора всеми при температуре +25 °С не более 3 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

11.2. Срок годности набора – 1 год.

11.3. В случае дробного использования набора компоненты должны храниться следующим образом:

- вскрытый планшет можно хранить в плотно закрытом пакете с осушителем при температуре + 2-8 °С не более 3 месяцев;

- контрольные сыворотки, конъюгаты, концентрат ТМБ, концентрат отмывочного раствора и субстратный буфер после вскрытия флаконов и пробирок можно хранить при температуре + 2-8 °С не более 2 месяцев;

- рабочий отмывочный раствор можно хранить в закрытой емкости при температуре + 2-8 °С не более 1 месяца;

- рабочий раствор субстрата хранению не подлежит;

- стоп-реагент можно хранить в закрытой емкости при комнатной температуре + (18-25) °С в течение всего срока годности.

11.4. Не допускать высыхания лунок планшета в период между промывкой и добавлением реагентов.

11.5. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

12. ПРИМЕЧАНИЯ

12.1. Полученные результаты не могут служить основанием для постановки диагноза и должны интерпретироваться только в комплексе с данными клинического наблюдения и результатами других диагностических процедур.

12.2. Данный тест не определяет локализацию инфекции.

12.3. Отсутствие значительного роста уровня антител не исключает наличия инфекции.

12.4. В образцах, собранных в очень ранний период инфекции, могут не определяться антитела класса IgG. В этом случае рекомендуется провести определение антител класса IgM или через 2-3 недели провести повторное исследование IgG антител параллельно с первичным образцом для определения сероконверсии.

12.5. Положительные результаты определения IgG у новорожденных должны интерпретироваться с осторожностью, так как материнские IgG пассивно переносятся от матери к плоду до рождения. Более полезным индикатором инфекции у детей в возрасте до 6 месяцев является определение антител класса IgM.

12.6. Определение антител в одиночном образце не является основанием для диагностики свежей инфекции. Парные образцы (в острый и реконвалесцентный период) должны быть собраны и протестированы для выявления сероконверсии или значительного повышения уровня антител.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО «Биотехлит» по адресу: 107143 Москва, ул. Лосиноостровская, 45, кор.7, телефон/факс: (499)167-21-72, или в ИСКЛС ФГУ НЦЭСМП Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14 а, тел: (495)120-60-95; 120-60-96.

Директор
ООО «Биотехлит»



ГОВОРУН В.М.

