

ТУ 9398-081-235 48142-2007

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации

_____ Г.Г. Онищенко

« ____ » _____ 2007 г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса М к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов
(ВектоВПГ – IgM)

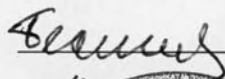
ВектоВПГ – IgM представляет собой набор реагентов (далее по тексту – набор) для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) на твёрдофазном носителе.

СОСТАВ НАБОРА

- иммуносорбент – антигены вируса простого герпеса (ВПГ), сорбированные в лунках 96-луночного разборного планшета;
- K⁺, положительный контрольный образец – сыворотка крови человека в разведении 1:100, содержащая антитела класса IgM к ВПГ, и не содержащая антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС, *Treponema pallidum*, а также HBsAg и антигена ВИЧ, инактивированная в течение 2 ч при температуре 56 °С – прозрачная красного цвета жидкость;
- K⁻, отрицательный контрольный образец – сыворотка крови человека в разведении 1:100, не содержащая антитела класса IgM к ВПГ, ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС, *Treponema pallidum*, а также HBsAg и антигенов ВИЧ, инактивированная в течение 2 ч при температуре 56 °С – слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость;
- конъюгат, концентрат – моноклональные антитела к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена – прозрачная синего цвета жидкость;
- раствор для предварительного разведения сывороток – прозрачная малинового цвета жидкость;
- раствор для разведения сывороток – непрозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость;

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича
Роспотребнадзора

 Н.В. Медуницын

«  » 2007 г.



- раствор для разведения конъюгата – слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – прозрачная бесцветная жидкость, допускается образование осадка солей, растворяющегося при нагревании до температуры от 30 до 40 °С в течение 20-30 мин, при встряхивании пенится;
- субстратный буферный раствор – прозрачная бесцветная жидкость;
- тетраметилбензидин, концентрат – хромоген – прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость;
- стоп-реагент – прозрачная бесцветная жидкость.

Активными реагентами набора являются антигены ВПГ, сорбированные в лунках разборного планшета, конъюгат, концентрат (мышинные моноклональные антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена), положительный и отрицательный контрольные образцы сывороток.

Способ определения IgM к ВПГ представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого происходит связывание специфических антител, содержащихся в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови, с сорбированными на поверхности лунок планшета антигенами ВПГ 1 и 2 типа и образование комплекса «антиген-антитело», который выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата.

Благодаря специальному блокатору, введенному в состав раствора для разведения сывороток, набор не дает ложноположительных результатов, обусловленных наличием ревматоидного фактора класса М в анализируемых образцах.

Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая анализ контрольных образцов. Возможны 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая анализ контролей.

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление иммуноглобулинов класса М к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов в сыворотке (плазме) крови человека.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Забор крови следует производить согласно стандартной процедуре забора крови из вены или из пальца с соответствующими предосторожностями.

– Свежие образцы следует хранить при температуре от 2 до 8 °C не более одной недели. При более длительном хранении – образцы следует держать при температуре минус 20 °C или ниже. Допускается однократное размораживание, после чего образцы следует тщательно перемешать.

– Образцы, содержащие осадок, перед анализом должны быть отцентрифугированы в течение 5 мин при 5-10 тыс. об/мин.

– Не следует использовать образцы с выраженной гиперлипидемией и образцы, содержащие в качестве консерванта азид натрия.

– Не следует использовать образцы с выраженной гиперлипидемией и образцы, содержащие в качестве консерванта азид натрия.

– Для отбора исследуемых образцов и реагентов набора следует использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5 %.

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил:

– Не использовать реагенты с истекшим сроком годности.

– Не заменять реагенты данной серии реагентами другой серии. Все реагенты подобраны для оптимального проведения теста.

– Не проводить ИФА в присутствии пыли или паров кислот, щелочей, альдегидов, которые могут менять ферментативную активность конъюгата.

– Использовать стеклянную посуду, тщательно вымытую и ополоснутую дистиллированной водой, или (предпочтительно) – одноразовую посуду.

– Перед использованием все реагенты набора следует выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25°C.

– Аккуратно готовить рабочие растворы реагентов, избегая любого загрязнения.

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

– Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускать контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом или рабочим раствором тетраметилбензидина.

– Использовать для внесения каждой пробы чистый наконечник.

– Никогда не использовать одну и ту же ёмкость для приготовления конъюгата и раствора тетраметилбензидина. Обращаем Ваше особое внимание на то, что малейшее, даже не видимое глазом загрязнение пипеток раствором конъюгата может привести к контаминации всего содержимого флаконов с субстратным буферным раствором и тетраметилбензидином, поэтому необходимо протирать рабочую поверхность стола и конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70 % этиловым спиртом перед внесением тетраметилбензидина в субстратный буферный раствор.

– Проверять пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы.

– Не изменять протокол исследования.

– Если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в неё новый образец. Такую лунку следует исключить из анализа.

Возможные причины занижения чувствительности:

– уменьшение времени инкубации (как правило, реакции с рабочим раствором тетраметилбензидина);

– использование загрязненной посуды и наконечников;

– замачивание посуды и наконечников в перекиси водорода или хлорсодержащих растворах без последующего кипячения в процессе мытья;

– плохая отмывка после инкубации сывороток;

– постановка ИФА с растворами, не нагретыми перед постановкой до комнатной температуры;

– размещение планшет в термостате стопкой;

– нарушение правил и сроков хранения вскрытых реагентов при детальном использовании набора.

Возможные причины ложноположительных результатов из-за погрешностей постановки:

– длительное внесение образцов по отношению к времени инкубации;

– плохая отмывка планшета после инкубации с рабочим раствором конъюгата;

– контаминированный вошер, гребенка;

– низкое качество дистиллированной воды;

- неправильная работа с пипетками;
- неправильное использование пленки для заклеивания планшета, приводящее к подсыханию раствора;
- контаминированные или с наличием клеточных элементов сыворотки.

Для получения правильного рабочего разведения исследуемых сывороток необходимо:

а) при отборе 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.

Для исключения взаимной контаминации сывороток во вспомогательных планшетах для предварительного разведения сывороток и в рабочем планшете необходима тщательная и аккуратная работа, без разбрызгивания растворов.

1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ И РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИФА

Для приготовления рабочих реагентов необходимо пользоваться таблицей расхода реагентов набора.

1.1 Стрипы планшета

В упаковке планшет должен быть выдержан в течение 30 мин при температуре от 18 до 25 °С для предотвращения конденсации влаги на стрипах.

Цефленовый пакет вскрывают на 1,0 см выше замка. Для проведения ИФА рассчитывают необходимое количество стрипов, оставшиеся стрипы снимают с рамки и сразу плотно упаковывают в цефленовый пакет с осушителем, удаляют из него воздух и плотно закрывают замок.

Хранение: после первого вскрытия цефленового пакета не более 4 нед. при температуре от 2 до 8 °С.

1.2 Контрольные образцы

Положительный и отрицательный контрольные образцы, K⁺ и K⁻, готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Хранение: после первого вскрытия флаконы хранят в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

1.3 Исследуемые образцы

Готовят непосредственно перед использованием!

В лунки вспомогательного планшета (можно использовать любой 96-луночный полистироловый планшет) вносят по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток и добавляют по 10 мкл образцов цельной сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешивают (разведение 1:10). При этом малиновый цвет должен измениться на жёлтый.

Хранение: не более 30 мин при комнатной температуре (от 18 до 25 °C).

1.4 Рабочий промывочный раствор (для отмывки планшета)

Перед использованием флакон с 25-кратным концентратом фосфатно-солевого буферного раствора с твином встряхивают. При обнаружении осадка солей в концентрате его в течение 20-30 мин прогревают при температуре от 30 до 40 °C до полного растворения осадка.

Отбирают из флакона необходимое количество концентрата (в зависимости от числа используемых стрипов, см. таблицу расхода реагентов набора), разводят в соответствующем количестве дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

Хранение: не более 1 нед. при температуре от 2 до 8 °C.

1.5 Рабочий раствор конъюгата

Готовят непосредственно перед использованием!

Количество рабочего раствора конъюгата, необходимое для данной постановки анализа, определяют, в зависимости от числа используемых стрипов, по таблице расхода реагентов набора (см. ниже).

В отдельный чистый флакон (пластиковую емкость) вносят необходимое количество раствора для разведения конъюгата, добавляют соответствующее количество концентрата конъюгата (см. таблицу расхода реагентов) и тщательно перемешивают.

Хранение: не более 30 мин при температуре от 18 до 25 °C.

1.6 Рабочий раствор тетраметилбензидина

Готовят непосредственно перед использованием!

Для проведения анализа на одном стрипе 70 мкл концентрата тетраметилбензидина растворяют в 1,0 мл субстратного буферного раствора в чистом флаконе (см. таблицу расхода реагентов набора).

При растворении следует исключить действие света, например, обернуть флакон фольгой.

Внимание! Раствор тетраметилбензидина должен быть бесцветным. Окрашивание раствора тетраметилбензидина в течение нескольких минут после приготовления рабочего раствора указывает на то, что реагент не может использоваться и должен быть заменён. К набору прилагаются пластиковая кювета и наконечники для пипетки, которые следует использовать только для работы с раствором тетраметилбензидина. При необходимости повторного использования, после работы посуду и наконечники следует ополоснуть водой, промыть 70 % этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой. Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором тетраметилбензидина, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку они даже в следовых количествах, могут вызвать неконтролируемое окисление тетраметилбензидина в ходе реакции.

Хранение: не более 20 мин при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

Таблица

Расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов планшета

Количество одновременно используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Рабочий промывочный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	тетраметилбензидин, концентрат, мкл	Субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Дистиллированная вода, 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

2. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (ИФА)

Подготавливают исследуемые образцы (п. 1.3), готовят рабочий промывочный раствор (п. 1.4). Контрольные положительный и отрицательный образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Все растворы и стрипы планшета должны быть комнатной температуры (18–25 °C).

2.1 Внесение контрольных и исследуемых образцов

В лунку А-1 вносят 100 мкл раствора для разведения сывороток. Лунка А-1 является контролем поглощения без конъюгата (бланк). В лунки В-1, С-1 и D-1 вносят по 100 мкл К⁻, отрицательного контрольного образца. В лунки Е-1, F-1 – по 100 мкл К⁺, положительного контрольного образца. В остальные лунки вносят по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови (п. 1.3).

2.2 Проведение инкубации

Планшет закрывают пленкой и инкубируют в термостате в течение 30 мин при температуре 37 °C. За 5 - 10 мин до окончания инкубации готовят рабочий раствор конъюгата (п. 1.5).

2.3 Промывание планшета

По окончании инкубации осторожно снимают пленку, помещают ее в дезинфицирующий раствор. Полностью удаляют жидкость из всех лунок в емкость с дезинфицирующим раствором и промывают, добавляя во все лунки по 350 мкл рабочего промывочного раствора, с последующим удалением. Процесс промывки повторяют 5 раз с помощью вошера или вручную (используя многоканальную пипетку). После каждой промывки тщательно удаляют остатки жидкости из лунок. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

2.4 Внесение конъюгата

В лунку А-1 добавляют 100 мкл раствора для разведения конъюгата. Во все остальные лунки вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

2.5 Проведение инкубации

Стрипы закрывают пленкой и инкубируют в термостате в течение 30 мин при температуре 37 °С. За 5-10 мин до окончания инкубации готовят рабочий раствор тетраметилбензидина (п.1.6).

2.6 Промывание планшета

По окончании инкубации удаляют содержимое лунок и промывают 5 раз рабочим промывочным раствором (по п. 2.3).

2.7 Внесение рабочего раствора тетраметилбензидина

Вносят в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина. Планшет помещают на 25 мин в защищенное от света место при температуре от 18 до 25 °С.

2.8 Добавление стоп-реагента

Реакцию останавливают добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента, используя ту же самую последовательность и скорость внесения, что и для раствора тетраметилбензидина.

В случае попадания на кожу раствора ТМБ или стоп-реагента необходимо немедленно смыть их водой с мылом.

РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допускается измерение оптической плотности на длине волны 450 нм, при этом выведение спектрофотометра на нулевой уровень

(«бланк») осуществляют по воздуху. Измерения проводят не позднее 15 мин после остановки реакции.

Реакцию учитывают при условии:

среднее арифметическое значений ОП в лунках с K^- ($ОП_{cp}K^-$) не превышает 0,250;

среднее арифметическое значений ОП в лунках с K^+ ($ОП_{cp}K^+$) не менее чем в 3 раза превышает $ОП_{cp}K^-$;

значение ОП в лунке А-1 (контроль ОП без конъюгата) не превышает 0,100.

Для оценки результатов анализа вычисляют контрольный уровень оптической плотности $ОП_{крит}$:

$$ОП_{крит} = ОП_{cp} K^- + 0,20.$$

Образец, дающий в лунках $ОП \geq ОП_{крит} + 10 \%$, считают положительным.

Образец, дающий в лунках $ОП \leq ОП_{крит} - 10 \%$, считают отрицательным.

Образец, дающий оптическую плотность, входящую в интервал $ОП_{крит} \pm 10 \%$, считают сомнительным. Рекомендуется повторно проанализировать этот образец параллельно с сывороткой того же больного, полученной через 7-14 дней. Если результат остаётся сомнительным после повторного исследования, для подтверждения диагноза герпесвирусной инфекции используют другие методы, например, выявление антигена или ДНК ВПГ.

ФОРМА ВЫПУСКА

Набор ВектоВПГ – IgM выпускают в виде комплекта реагентов, упакованного в пачку из картона коробочного:

–Иммуносорбент – планшет разборный с сорбированными антигенами ВПГ, упакованный в пакет размером 115×150 мм из полиэтиленовой плёнки или из цефлена с осушителем силикагелем

– 1 шт.;

– K^+ , положительный контрольный образец

– 1 фл., 1,5 мл;

– K^- , отрицательный контрольный образец

– 1 фл., 3,0 мл;

– Конъюгат, концентрат	– 1 фл., 1,5 мл;
– Раствор для предварительного разведения сывороток	– 1 фл., 10,0 мл;
– Раствор для разведения сывороток	– 1 фл., 12,0 мл;
– Раствор для разведения конъюгата	– 1 фл., 12,0 мл;
– Тетраметилбензидин, концентрат	– 1 фл., 1,0 мл;
– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином	– 2 фл. по 28,0 мл;
– Субстратный буферный раствор	– 1 фл., 13,0 мл;
– Стоп-реагент	– 1 фл., 12,0 мл;
– Инструкция по применению	– 1 экз.

В комплект поставки набора входят:

– Пленка для заклеивания планшета	– 2 шт.;
– Пластиковая ванночка для реагентов	– 2 шт.;
– Наконечники для пипетки на 4-200 мкл	– 16 шт.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 9 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Набор хранят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Набор транспортируют в соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8 °С; допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для лечебно-профилактических, санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора направлять:

в Федеральное государственное учреждение науки Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича

Вектор-Бест-ТГМ

Роспотребнадзора по адресу: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел. (495) 241-39-22;

в адрес предприятия-изготовителя ЗАО «Вектор-Бест»: 630559, Новосибирская обл., Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел./факс (383) 336-73-46, e-mail: vbobtk@vector-best.ru

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

Руководитель Государствен-
ных испытаний

М.С. Воробьева