

«УТВЕРЖДАЮ»
Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

П.Г. Каленик
«1» июня 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения антител IgG к вирусу герпеса первого типа (Herpes-Simplex Virus 1 (HSV1) IgG)

производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)

Вирус простого герпеса 1 IgG (HSV 1 IgG)

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1-го типа в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

IVD

ВВЕДЕНИЕ

Инфекция, вызываемая вирусом простого герпеса (ВПГ), широко распространена во всем мире. Инкубационный период заболевания составляет от 2 до 26 дней (обычно около недели), клинические симптомы включают поражения гениталий и ротовой полости.

Особенностью инфекции, вызываемой вирусом простого герпеса, является возможность передачи ее от зараженной матери новорожденному во время родов. Герпетическая инфекция у детей младше 6 недель часто остается не диагностированной. При этом смертность инфицированных новорожденных, не получающих соответствующего лечения, достигает 65%, а у выживших детей нередко наблюдается ряд нарушений, ведущих к инвалидности.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест основан на классическом методе двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа. Антигенный материал, выделенный из клеточной культуры, зараженной ВПГ 1-го типа, адсорбирован на лунках микропланшета. На первой стадии инкубации антитела к ВПГ 1, содержащиеся в контролях и исследуемых образцах, связываются с иммобилизованными антигенами. После промывки, удаляющей не связавшиеся компоненты сывороток, в лунки добавляется конъюгат, представляющий собой антитела к IgG человека, меченые пероксидазой хрена (HRP). В результате инкубации (стадия 2) конъюгат специфически связывается на поверхности лунок с антителами класса IgG, образуя типоспецифические иммунокомплексы. После повторной промывки, удаляющей не связавшийся конъюгат, в лунки вносится субстрат (стадия 3). Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом ТМБ приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна уровню IgG к ВПГ 1 в образце и может быть определена фотометрированием при 450 нм. Результат интерпретируется как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением уровня отсечения cut-off, или рассчитывается в специальных единицах фирмы HUMAN (HU/мл) с использованием положительного контроля в качестве калибратора.

МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ И ИХ СОСТАВ

MIC	Стрипы 8-луночные (код HS1 G, в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, с иммобилизованным антигеном ВПГ 1; в упаковке с влагопоглотителем	12 шт.
NC	ВПГ 1 IgG отрицательный контроль (зеленая крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
PC	ВПГ 1 IgG положительный контроль (красная крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
DIL-G 5121	Буфер для разведения IgG образцов (белая крышка) Готовый к использованию 0,01 М фосфатный буфер, <u>зеленого цвета</u> ; содержит 8 г/л хлорида натрия и 10 г/л альбумина; pH 6,5±0,2	1×100 мл
CON	Конъюгат анти-IgG (белая крышка) Готовый к использованию раствор кроличьих антител к IgG человека, меченых пероксидазой хрена, <u>красного цвета</u>	1×12 мл

WS 5102	Промывочный раствор (белая крышка) Концентрат (на 1000 мл готового раствора, содержащего 10 ммоль/л трис-солевого буфера и 8 г/л хлорида натрия; pH 7,2±0,2)	1×50 мл
SUB 5103	Субстратный реагент (черная крышка) Готовый к использованию, бесцветный или голубоватый; содержит 1,2 ммоль/л 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и 3 ммоль/л перекиси водорода; pH 3,7±0,2	1×13 мл
STOP 5104	Стоп-реагент (красная крышка) Готовый к использованию, содержит 0,5 М серную кислоту	1×15 мл
	Клейкая пленка для стрипов	2 шт.

- Общее содержание консервантов в реагентах составляет < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не пилитируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования. Избегайте контакта с кожей и слизистыми. Проверка контролей, входящих в состав набора, на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBsAg, дала отрицательный результат. В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) пользуйтесь защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

После исследования все материалы, контактировавшие с образцами пациентов или контролями, должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом).

Стоп-реагент **STOP** содержит серную кислоту, способную вызвать ожоги глаз, кожи и слизистых покровов. При контакте с этим реагентом тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, в условиях хранения при температуре 2-8 °С.

После вскрытия флаконов реагенты пригодны к использованию в течение 2 месяцев.

Стрипы **MIC** (код HS1 G)

- Планшет, состоящий из 12 стрипов в рамке-держателе, запаян под вакуумом в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.
- Перед вскрытием упаковку с планшетом следует прогреть до комнатной температуры.
- Неиспользованные стрипы необходимо вернуть обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застежкой и хранить в таком виде при температуре 2-8 °С.

Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием дайте всем реагентам прогреться до **комнатной температуры**. (15-25 °С). Неиспользуемые реагенты следует всегда хранить при температуре 2-8 °С.

Примечание: Реагенты общего назначения **DIL-G 5121**, **WS 5102**, **SUB 5103** и **STOP 5104** взаимозаменяемы между различными партиями (лотами) набора и различными наборами фирмы HUMAN. В ИФА тестах на IgG антитела используйте только IgG буфер для разведения образцов **DIL-G 5121**.

Все остальные реагенты **специфичны к конкретной партии (лоту)** набора и не могут быть заменены реагентами из другой партии. При работе с данным набором не допускается использование каких-либо реагентов других производителей.

Рабочий раствор промывочного буфера **WASH**

- Для получения рабочего раствора промывочного буфера разведите концентрат **WS 5102** в соотношении 1+20 свежей дистиллированной водой (например: 50 мл концентрата **WS 5102** + 1000 мл дистиллированной воды = 1050 мл).
- Стабильность: **до 60 дней при температуре 15-25 °С**.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотки

Не используйте образцы с сильным гемолизом или липемией.

Образцы могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8 °С, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20 °С. Допускается **только однократное замораживание**. Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите последние центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не смешивайте реагенты из разных партий наборов. Не путайте крышки от флаконов. Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера контролей и образцов в листок-формуляр, приложенный к оригиналу инструкции.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов **MIC** или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование контролей должно проводиться в дубликатах. Вносить образцы и контроли необходимо как можно ближе ко дну лунки.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины образцов. Если для анализа используется больше одного планшета, контроли следует ставить с каждым из них.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Добавление рабочего раствора субстрата **SUB** инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента **STOP**. Во время развития окраски инкубируйте планшеты в темноте.

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок в 5% раствор гипохлорита натрия и внесите в них рабочий раствор промывочного буфера **WASH**. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку еще три раза.

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его рабочим раствором промывочного буфера **WASH** и промойте лунки 4 или 5 раз. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял лунки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости должен быть менее 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть прогреты до комнатной температуры.

Подготовка образцов:

Разведите сыворотки пациентов в соотношении 1+100 IgG буфером для разведения образцов **DIL-G 5121**. Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 1 мл буфера **DIL-G 5121** и тщательно перемешайте.

Разведенные образцы до проведения анализа могут храниться в течение 48 часов при температуре 2-8 °C.

Контроли готовы к использованию и разведения не требуют.

Стадия 1	Лунка [объем жидкости в мкл]			
	A1 бланк	B1/C1 Отриц. контроль NC	D1/E1 Полож. контроль PC	F1... Образец
Внесите в лунки:				
NC в две лунки	--	100	--	--
PC в две лунки	--	--	100	--
разведенный образец	--	--	--	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 4 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350

Стадия 2				
Внесите в лунки:				
Конъюгат анти-IgG CON	--	100	100	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 5 раз, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 3				
Внесите в лунки:				
Субстратный реагент SUB 5103	100	100	100	100
Инкубируйте 15 минут при 17-25 °C (см. P8).				
Добавьте стоп-реагент STOP 5104	100	100	100	100
Тщательно перемешайте.				
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.				
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение не более чем 30 минут) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм, используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.				

РАСЧЕТ КОНТРОЛЬНЫХ ВЕЛИЧИН И Cut-off

Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля **NC** в лунках B1 и C1 – (**MNC**) и положительного контроля **PC** в лунках D1 и E1 (**MPC**) рассчитывается по формулам:

$$MNC = \frac{ОП_{450}(B1) + ОП_{450}(C1)}{2} \quad MPC = \frac{ОП_{450}(D1) + ОП_{450}(E1)}{2}$$

Значение уровня отсечения, cut-off (COV), рассчитывается по формуле:

$$COV = MNC + (0,1 \times MPC)$$

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

1. ОП бланка в лунке A1 < 0,150
2. $MNC \leq 0,250$
3. $MPC \geq 0,750$
4. $MPC : MNC \geq 5$

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Если $ОП_{450}$ в лунке с исследуемой сывороткой $\geq COV + 15\%$, результат считается **положительным по анти-ВПГ 1 IgG**.
- Если $ОП_{450}$ в лунке с исследуемой сывороткой $< COV - 15\%$, результат считается **отрицательным по анти-ВПГ 1 IgG**.

В силу физиологической и аналитической изменчивости, значения, лежащие в пределах 15% диапазона по обе стороны cut-off, являются **неопределенными** (серая зона). Образцы, показавшие неопределенный результат, рекомендуется проанализировать повторно, параллельно со свежей сывороткой, взятой через 7-14 дней, ставя каждую из сывороток в дубликатах. При интерпретации изменения уровня специфических антител необходимо также учитывать анамнез и данные других исследований. Образцы, повторно давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать подтверждающим тестом.

Количественные результаты, отражающие изменение концентрации специфических IgG антител к ВПГ 1, следует интерпретировать с осторожностью. Серотипы 1 и 2 ВПГ обладают высокой перекрестной реактивностью. Инфицирование вирусом одного серотипа может отразиться на повышении уровня антител к антигенам другого серотипа при серодиагностике. Для определения того, каким из двух серотипов ВПГ инфицирован пациент, необходимо провести параллельное определение IgG к ВПГ 1 и ВПГ 2. Исследование, показавшее более высокий уровень IgG (выраженный в единицах HUMAN, HU/мл), будет указывать на серотип вируса. Для более точного определения серотипа рекомендуется выделить вирус и исследовать его с помощью типоспецифической сыворотки. Вследствие перекрестной реактивности повышенный уровень IgG антител к ВПГ 1 может наблюдаться при латентно протекающих и

реактивирующихся инфекциях, вызванных другими герпесвирусами. Для правильной интерпретации результатов исследования следует исключить наличие подобной инфекции.

При отсутствии фотометра возможен визуальный учет результатов, при этом необходимо соблюдение следующих условий:

- Лунка A1 с бланком должна быть бесцветной на глаз.
- Образец считается положительным, если окраска лунки с образцом явно интенсивнее, чем окраска лунок B1/C1 с отрицательным контролем **NC**.

Расчет концентрации анти-ВПГ 1 IgG антител в единицах HUMAN

Положительные результаты определения IgG к ВПГ 1 могут быть рассчитаны в специальных единицах фирмы HUMAN (HU/мл).

$$\text{HU/мл} = \frac{\text{ОП}_{\text{образца}}}{\text{MPC}} \times 100$$

где ОП_{образца} - среднее значение оптической плотности ОП₄₅₀ в лунках с образцом;

MPC - среднее значение оптической плотности ОП₄₅₀ в лунках с положительным контролем.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста HSV 1 IgG фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/qb/vr/el-hsv1g.pdf> или
<http://www.human.de/data/qb/vr/el-hsv1g.pdf>

Примечание

Компоненты набора стабильны до окончания указанного срока годности даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента зависит от количества отборов реагентов. 60-дневный срок использования реагентов установлен из соображений надежности получения результатов.

При работе с набором следует обеспечить постоянное соблюдение в лаборатории основных требований GLP (надлежащей лабораторной практики).

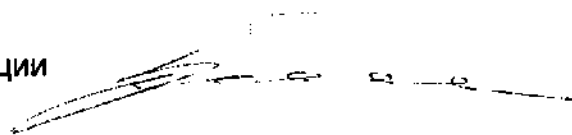
Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы их собственными крышками немедленно после отбора реагентов; отбирать только необходимое количество реагента, если предполагается его соприкосновение с другими растворами, способными вызвать контаминацию, например образцами пациентов; как можно быстрее возвращать исходные реагенты, если они не используются, в стандартные условия хранения (2-8 °C). Всегда должно проверяться соблюдение условий достоверности результатов теста.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

«УТВЕРЖДАЮ»
Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

Г.Г. Каленик
12 июня 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для определения антител IgG к вирусу герпеса второго типа
(Herpes-Simplex Virus 2 (HSV2) IgG)
производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)**

Вирус простого герпеса 2 IgG (HSV 2 IgG)

Иммуноферментный тест для полуколичественного определения антител класса IgG к вирусу простого герпеса 2-го типа в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

IVD

ВВЕДЕНИЕ

Инфекция, вызываемая вирусом простого герпеса (ВПГ), широко распространена во всем мире. Инкубационный период заболевания составляет обычно около недели (от 2 до 26 дней), клинические симптомы включают поражения herpes genitalis и labialis.

Особенностью инфекции, вызываемой вирусом простого герпеса, является возможность передачи ее от зараженной матери новорожденному во время родов. Герпетическая инфекция у детей младше 6 недель часто сопряжена с огромным риском. При этом смертность инфицированных новорожденных, не получающих соответствующего лечения, достигает 65%, а у выживших детей нередко наблюдается ряд нарушений, ведущих к инвалидности. Заражение, как правило, происходит во время родов, при прохождении плода по родовым путям матери.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест основан на классическом методе двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа. Антигенный материал, выделенный из клеточной культуры, зараженной ВПГ 2-го типа, адсорбирован на лунках микропланшета. На первой стадии инкубации антитела к ВПГ 2, содержащиеся в контролях и исследуемых образцах, связываются с иммобилизованными антигенами. После промывки, удаляющей несвязавшиеся компоненты сывороток, в лунки добавляется конъюгат, представляющий собой антитела к IgG человека, меченые пероксидазой хрена (HRP). В результате инкубации (стадия 2) конъюгат специфически связывается на поверхности лунок с антителами класса IgG, образуя типоспецифические иммунокомплексы. После повторной промывки, удаляющей несвязавшийся конъюгат, в лунки вносится субстрат (стадия 3). Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом ТМБ приводит к образованию окрашенного в синий цвет продукта реакции, который меняется на желтый при остановке реакции стоп-реагентом. Интенсивность окраски комплекса пропорциональна уровню IgG к ВПГ 2 в образце и может быть определена фотометрированием при 450 нм. Результат интерпретируется как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением уровня отсечения cut-off, или рассчитывается в специальных единицах фирмы HUMAN (HU/мл) с использованием положительного контроля в качестве калибратора.

МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ И ИХ СОСТАВ

MIC	Стрипы 8-луночные (код HS2 G, в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, с иммобилизованным антигеном ВПГ 2; в упаковке с влагопоглотителем	12 шт.
NC	ВПГ 2 IgG отрицательный контроль (зеленая крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
PC	ВПГ 2 IgG положительный контроль (красная крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
DIL-G 5121	Буфер для разведения IgG образцов (белая крышка) Готовый к использованию 0,01 М фосфатный буфер, <u>зеленого цвета</u> ; содержит 8 г/л хлорида натрия и 10 г/л альбумина; pH 6,5±0,2	1×100 мл

CON	Конъюгат анти-IgG (белая крышка) Готовый к использованию раствор кроличьих антител к IgG человека, меченых пероксидазой хрена, <u>красного цвета</u>	1×12 мл
WS 5102	Промывочный раствор (белая крышка) Концентрат (на 1000 мл готового раствора, содержащего 10 ммоль/л трис-солевого буфера и 8 г/л хлорида натрия; pH 7,2±0,2)	1×50 мл
SUB 5103	Субстратный реагент (черная крышка) Готовый к использованию, бесцветный или голубоватый; содержит 1,2 ммоль/л 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и 3 ммоль/л перекиси водорода; pH 3,7±0,2	1×13 мл
STOP 5104	Стоп-реагент (красная крышка) Готовый к использованию, содержит 0,5 М серную кислоту	1×15 мл
	Клейкая пленка для стрипов	2 шт.

- Общее содержание консервантов в реагентах составляет < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования. Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми. Проверка контролей, входящих в состав набора, на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBsAg, дала отрицательный результат. В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) пользуйтесь защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

После исследования все материалы, контактировавшие с образцами пациентов или контролями, должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом).

Стоп-реагент **STOP** содержит серную кислоту, способную вызвать ожоги глаз, кожи и слизистых покровов. При контакте с этим реагентом тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, в условиях хранения при температуре 2-8 °С.

После вскрытия флаконов реагенты пригодны к использованию в течение 2 месяцев при хранении при температуре 2-8 °С.

Стрипы **MIC** (код HS2 G)

- Планшет, состоящий из 12 стрипов в рамке-держателе, запаян под вакуумом в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.
- Перед вскрытием упаковку с планшетом следует прогреть до комнатной температуры.
- Неиспользованные стрипы необходимо вернуть обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застежкой и хранить в таком виде при температуре 2-8 °С.

Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием прогрейте все реагенты до **комнатной температуры**. (15-25 °С). Неиспользуемые реагенты следует всегда хранить при температуре 2-8 °С.

Примечание: Реагенты общего назначения **DIL-G 5121**, **WS 5102**, **SUB 5103** и **STOP 5104** взаимозаменяемы между различными партиями (лотами) набора и различными наборами фирмы HUMAN. В ИФА тестах на IgG антитела используйте только IgG буфер для разведения образцов **DIL-G 5121**.

Все остальные реагенты **специфичны к конкретной партии (лоту)** набора и не могут быть заменены реагентами из другой партии. При работе с данным набором не допускается использование каких-либо реагентов других производителей.

Рабочий раствор промывочного буфера **WASH**

- Для получения рабочего раствора промывочного буфера разведите концентрат **WS 5102** в соотношении 1:20 свежей дистиллированной водой (например: 50 мл концентрата **WS 5102** + 1000 мл дистиллированной воды = 1050 мл).
- Стабильность: **до 60 дней при температуре 15-25 °С**.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотки

Не используйте образцы с сильным гемолизом или липемией.

Образцы могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8 °C, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20 °C. Допускается только однократное замораживание. Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите последние центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не путайте крышки от флаконов (риск контаминации). Не пользуйтесь реагентами с истекшим сроком годности.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера контролей и образцов в листок-формуляр, приложенный к оригиналу инструкции.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов **MIC** или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование контролей должно проводиться в дубликатах. Вносить образцы и контроли необходимо как можно ближе к дну лунки.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины образцов. Если для анализа используется больше одного планшета, контроли следует ставить с каждым из них.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Добавление рабочего раствора субстрата **SUB** инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента **STOP**. Во время развития окраски инкубируйте планшеты в темноте.

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок в 5% раствор гипохлорита натрия и внесите в них рабочий раствор промывочного буфера **WASH**. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку еще трижды (всего 4 раза).

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его рабочим раствором промывочного буфера **WASH** и промойте лунки 5 раз. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял лунки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости должен быть менее 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть прогреты до комнатной температуры.

Подготовка образцов:

Разведите сыворотки пациентов в соотношении 1:100 IgG-буфером для разведения образцов **DIL-G 5121**. Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 1 мл буфера **DIL-G 5121** и тщательно перемешайте.

Разведенные образцы до проведения анализа могут храниться в течение 48 часов при температуре 2-8 °C.

Контроли готовы к использованию и разведения не требуют.

Стадия 1 Внесите в лунки:	Лунка [объем жидкости в мкл]			
	A1 бланк	B1/C1 Отриц. контроль NC	D1/E1 Полож. контроль PC	F1... Образец
NC в две лунки	--	100	--	--
PC в две лунки	--	--	100	--
Разведенный образец	--	--	--	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 4 раза, как описано (см. W1 – W3).				

Рабочий раствор промывочного буфера [WASH]	350	350	350	350
Стадия 2				
Внесите в лунки:				
Конъюгат анти-IgG [CON]	~	100	100	100
Закройте стрипы [MIC] клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 5 раз, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера [WASH]	350	350	350	350
Стадия 3				
Внесите в лунки:				
Субстратный реагент [SUB] 5103	100	100	100	100
Инкубируйте 15 минут при 17-25 °C в темноте (см. P8).				
Добавьте стоп-реагент [STOP] 5104	100	100	100	100
Тщательно перемешайте.				
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.				
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение не более чем 30 минут) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм, используя (по возможности) референсную длину волны 630-690 нм.				

РАСЧЕТ КОНТРОЛЬНЫХ ВЕЛИЧИН И Cut-off

Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля [NC] в лунках B1 и C1 – (MNC) и положительного контроля [PC] в лунках D1 и E1 (MPC) рассчитывается по формулам:

$$MNC = \frac{ОП_{450}(B1) + ОП_{450}(C1)}{2} \quad MPC = \frac{ОП_{450}(D1) + ОП_{450}(E1)}{2}$$

Значение уровня отсечения, cut-off (COV), рассчитывается по формуле:

$$COV = MNC + (0,1 \times MPC)$$

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

1. ОП бланка в лунке A1 < 0,150
2. MNC ≤ 0,250
3. MPC ≥ 0,750
4. MPC:MNC ≥ 5

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой ≥ COV + 15%, результат считается **положительным по анти-ВПГ 2 IgG**.
- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой < COV - 15%, результат считается **отрицательным по анти-ВПГ 2 IgG**.

В силу физиологической и аналитической изменчивости, значения, лежащие в пределах 15% диапазона по обе стороны cut-off, являются **неопределенными** (серая зона). Образцы, показавшие неопределенный результат, рекомендуется проанализировать повторно, параллельно со свежей сывороткой, взятой через 7-14 дней, ставя каждую из сывороток в дубликатах. При интерпретации изменения уровня специфических антител необходимо также учитывать анамнез и данные других исследований. Образцы, повторно давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать подтверждающим тестом.

Степень изменения концентрации специфических IgG антител к ВПГ 2, следует интерпретировать с осторожностью. Серотипы 1 и 2 ВПГ обладают высокой перекрестной реактивностью. Инфицирование вирусом одного серотипа может отразиться на повышении уровня антител к антигенам другого серотипа при серодиагностике. Для определения того, каким из двух серотипов ВПГ инфицирован пациент, необходимо провести параллельное определение IgG к ВПГ 1 и ВПГ 2. Исследование, давшее более высокий уровень IgG (выраженный в единицах HUMAN, HU/мл), будет указывать на серотип вируса. Для более точного

определения серотипа рекомендуется выделить вирус и исследовать его с помощью типоспецифической сыворотки. Вследствие перекрестной реактивности повышенный уровень IgG антител к ВПГ 2 может наблюдаться при латентно протекающих и реактивированных инфекциях, вызванных другими герпесвирусами. Для правильной интерпретации результатов исследования следует исключить наличие подобной инфекции.

При отсутствии фотометра возможен визуальный учет результатов, при этом необходимо соблюдение следующих условий:

- Лунка A1 с бланком должна быть бесцветной на глаз.
- Образец считается положительным, если окраска лунки с образцом явно интенсивнее, чем окраска лунок B1/C1 с отрицательным контролем **NC**.

Расчет концентрации анти-ВПГ 2 IgG антител в единицах HUMAN

Положительные результаты определения IgG к ВПГ 2 могут быть рассчитаны в специальных единицах фирмы HUMAN (HU/мл).

$$\text{HU/мл} = \frac{\text{ОП}_{\text{образца}}}{\text{MPC}} \times 100$$

где ОП_{образца} - среднее значение оптической плотности ОП₄₅₀ в лунках с образцом;

MPC - среднее значение оптической плотности ОП₄₅₀ в лунках с положительным контролем.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста HSV 2 IgG фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/qb/vr/el-hsv2g.pdf> или
<http://www.human.de/data/qb/vr/el-hsv2g.pdf>

Примечание

Компоненты набора стабильны до окончания указанного срока годности даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента зависит от количества отборов реагентов. 60-дневный срок использования реагентов установлен из соображения надежности получения результатов.

При работе с набором следует обеспечить постоянное соблюдение в лаборатории основных требований GLP (надлежащей лабораторной практики).

Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы их собственными крышками немедленно после отбора реагентов; отбирать только необходимое количество реагента, если предполагается его соприкосновение с другими растворами, способными вызвать контаминацию, например образцами пациентов; как можно быстрее возвращать исходные реагенты, если они не используются, в стандартные условия хранения (2-8 °C). Всегда должно проверяться соблюдение условий достоверности результатов теста.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции

К.И. Бланк

«УТВЕРЖДАЮ»
Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

Г.Т. Каленик
« 1 » июня 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для определения антител IgM к вирусу герпеса первого и второго типов
(Herpes-Simplex Virus (HSV) IgM)
производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)**

Вирус простого герпеса IgM (HSV IgM)

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgM к вирусу простого герпеса в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, вызываемые вирусом простого герпеса (ВПГ), широко распространены во всем мире. Инкубационный период заболевания составляет от 2 до 26 дней (обычно около недели), клинические симптомы включают поражения гениталий и ротовой полости. Особенностью инфекции, вызываемой вирусом простого герпеса, является возможность передачи ее от зараженной матери новорожденному во время родов. Герпетическая инфекция у детей младше 6 недель часто остается не диагностированной. При этом смертность инфицированных новорожденных, не получающих соответствующего лечения, достигает 65%, а у выживших детей нередко наблюдается ряд нарушений, ведущих к инвалидности. Заражение, как правило, происходит при рождении, когда плод проходит через инфицированные родовые пути.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест HUMAN HSV IgM ELISA основан на классическом методе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). На лунках микропланшета адсорбирован дериват клеточной культуры, зараженный вирусом простого герпеса (HSV-Ag). На первой стадии инкубации специфические антитела HSV-IgM, содержащиеся в контролях и исследуемых образцах, связываются с иммобилизованными антигенами. Буфер для разведения проб содержит антитела к IgG человека для предотвращения влияния ревматоидного фактора и устранения конкуренции специфического IgG за связывание с антигеном. После промывки, удаляющей несвязавшиеся компоненты сывороток, в лунки добавляют конъюгат, представляющий собой антитела к IgM человека, меченые пероксидазой хрена (HRP). В результате инкубации (стадия 2) конъюгат специфически связывается на поверхности лунок с антителами класса IgM, образуя типичные иммунные комплексы.

После повторной промывки, удаляющей несвязавшийся конъюгат, в лунки вносят субстрат (стадия 3). Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом ТМБ приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет с голубого на желтый после добавления стоп-реагента. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации HSV-IgM антител в пробе.

Оптическую плотность контролей и проб измеряют на микропланшетном фотометре с длиной волны 450 нм или автоматическом анализаторе для ИФА (например, HUMAREADER или ELISYS, HUMAN). Результат интерпретируется как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением уровня отсечения (cut-off).

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Необходимые реагенты, входящие в состав набора для выполнения 96 определений:

MIC	Стрипы 8-луночные (код HSV M, в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, с иммобилизованным антигеном ВПГ 1 и 2 типа; в упаковке с влагопоглотителем	12
NC	HSV IgM отрицательный контроль (зеленая крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
PC	HSV IgM положительный контроль (красная крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
DIL-M 5111	IgM буфер для разведения образцов (голубая крышка) Готовый к использованию 0,01 М фосфатный буфер, <u>зеленого цвета</u> ; содержит 8 г/л хлорида натрия, 10 г/л альбумина и антитела козы к IgG человека; pH 6,5±0,2	1×100 мл

Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте планшет 4 раза как описано выше (см. Методика промывки W1-3)				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
2 стадия				
Внесите в лунки				
Конъюгат CON	—	100	100	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (17-25 °C).				
Промойте планшет 5 раз как описано выше (см. Методика промывки W1-3)				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
3 стадия				
Внесите в лунки				
Субстрат SUB 5103	100	100	100	100
Инкубируйте планшет 15 минут в темном месте при комнатной температуре (17-25 °C) (см. Предварительные замечания, P8).				
Стоп-реагент STOP 5104	100	100	100	100
Тщательно перемешайте				
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.				
Измерьте оптическую плотность при 450 нм как можно быстрее или в течение 30 мин, после остановки реакции, используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.				

Расчет контрольных показателей и cut-off

Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля **NC** в лунках B1 и C1 – (**MNC**) и положительного контроля **PC** в лунках D1 и E1 (**MPC**) рассчитывается по формулам:

$$MNC = \frac{ОП_{450}(B1) + ОП_{450}(C1)}{2}$$

$$MPC = \frac{ОП_{450}(D1) + ОП_{450}(E1)}{2}$$

Уровень отсеечения (cut-off) рассчитывается по формуле:

$$Cut-off = MNC + (0,2 \times MPC)$$

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

- Бланк < 0,150
- MNC ≤ 0,250
- MPC ≥ 0,400
- MPC : MNC ≥ 3

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ОП₄₅₀ (пациента) ≥ Cut off + 15 %:

результат считается **положительным**

ОП₄₅₀ (пациента) < Cut off - 15 %:

результат считается **отрицательным**

В силу физиологической и аналитической изменчивости, значения, лежащие в пределах 15 % диапазона по обе стороны cut-off, являются **неопределенными** (серая зона). Образцы, показавшие неопределенный результат, рекомендуется проанализировать повторно, параллельно со свежей сывороткой, взятой через 7-14 дней, ставя каждую из сывороток в дубликатах. При интерпретации результатов IgM теста необходимо также учитывать тенденцию изменения уровня специфических антител IgG, равно как анамнез и данные других исследований. Положительные пробы, а также пробы, повторно давшие неопределенный результат, необходимо исследовать подтверждающим тестом.

Вследствие перекрестной реактивности повышенный уровень IgM антител к ВПГ может наблюдаться при латентно протекающих инфекциях, вызванных другими герпесвирусами. Для правильной интерпретации результатов исследования следует исключить наличие подобной инфекции.

Нативные сыворотки могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8°C, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20°C. **Допускается только однократное замораживание.** Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите последние центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не путайте крышки от флаконов во избежание контаминации. Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера контролей и проб в листок-формуляр, приложенный к оригиналу инструкции.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов **MIC** или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование контролей должно проводиться в дубликатах. Вносить пробы и контроли необходимо как можно ближе ко дну лунки.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины проб. Если для анализа используется больше одного микропланшета, контроли следует ставить с каждым из них.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Инкубацию с субстратом **SUB** проводят в темноте. Добавление рабочего раствора субстрата инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента **STOP**.

P9: Помутнение буфера для разведения образцов **DIL-M** после добавления в него сыворотки не влияет на результаты исследования.

Методика промывки

Промывка лунок является **исключительно важной стадией**. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок в емкость с дезинфицирующим раствором (например, 5 % раствор натрия гипохлорида) и внесите в них промывочный буфер **WASH**. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку еще 3 раза (всего 4 раза).

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его промывочным буфером **WASH** и промойте лунки 5 раз. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял ячейки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости не должен превышать 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым микропланшетом (стрипом) о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Реагенты и пробы должны быть прогреты до комнатной температуры перед использованием.				
Подготовка проб				
Разведите сыворотки пациентов в соотношении 1+100 с использованием IgM буфера для разведения образцов DIL-M 5111 . Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 1 мл буфера DIL-M 5111 и тщательно перемешайте (см. <i>Предварительные замечания</i> , п.9).				
Прежде, чем продолжать исследование, разведенные образцы необходимо выдержать, как минимум, 5 минут при комнатной температуре.				
Разведенные пробы могут храниться в течение 24 часов при температуре 2-8 °C.				
Контроли готовы к использованию и разведения не требуют.				
1 стадия	Лунки (объем жидкости в мкл)			
Внесите в лунки	A1 Бланк	B1/C1 NC	D1/E1 PC	F1... Образец
Отрицательный контроль NC в две лунки	--	100	--	--
Положительный контроль PC в две лунки	--	--	100	--
Разведенные сыворотки	--	--	--	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				

CON	Конъюгат анти-IgM (белая крышка) Готовый к использованию раствор кроличьих антител к IgM человека, меченых пероксидазой хрена; <u>красного цвета</u>	1×12 мл
WS 5102	Промывочный раствор (белая крышка) Концентрат (на 1000 мл готового раствора, содержащего 10 ммоль/л трис-солевого буфера и 8 г/л хлорида натрия; pH 7,2±0,2)	1×50 мл
SUB 5103	Субстратный реагент (черная крышка) Готовый к использованию, бесцветный или светло-голубой, содержит 1,2 ммоль/л 3,3',5,5' тетраметилбензидина (ТМБ) и 3 ммоль/л перекиси водорода; pH 3,7±0,2	1×13 мл
STOP 5104	Стоп-реагент (красная крышка) Готовый к использованию, содержит серную кислоту 0,5 моль/л	1×15 мл
	Пленка для заклейки стрипов	2

- Общее содержание консервантов в реагентах составляет < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищу во время исследования.
- Избегайте контакта реагентов и проб с кожей и слизистыми оболочками.
- Пользуйтесь специальной одеждой и одноразовыми перчатками.
- Контроли, входящие в состав набора, проверены на отсутствие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBs-антигена, тем не менее обращаться с контролями и пробами пациентов надлежит как с потенциально инфицированными материалами.
- После исследования все материалы, контактировавшие с исследуемыми пробами или калибраторами, должны быть подвергнуты дезактивации автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, или замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа.
- Стоп-реагент **STOP** оказывает раздражающее действие на глаза, кожу и слизистые оболочки. При попадании этого реагента на кожный покров и слизистые оболочки тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, при условии хранения при температуре 2-8 °С.

После вскрытия флаконов реагенты пригодны к использованию в течение 60 дней (см. также «Примечания»).

Стрипы **MIC** (код HSV M)

- микропланшет герметично упакован в фольгируемый пакет с влагопоглотителем.
 - перед вскрытием упаковку с микропланшетом следует прогреть до комнатной температуры.
 - неиспользованные стрипы необходимо положить обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застежкой и хранить в таком виде при температуре 2...8 °С.
- Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием прогрейте все реагенты до комнатной температуры (15...25°C).

Не используемые реагенты должны всегда храниться при температуре 2...8°C.

Примечание: Реагенты общего назначения **DIL-M 5111**, **WS 5102**, **SUB 5103** и **STOP 5104** взаимозаменяемы между различными лотами набора и различными наборами фирмы HUMAN. В ИФА тестах на IgM антитела используйте только IgM буфер для разведения образцов **DIL-M 5111**.

Все остальные реагенты специфичны к конкретной партии (лоту) набора и не могут быть заменены реагентами из другой партии. При работе с данным набором не допускается использование каких-либо реагентов других производителей.

Промывочный буфер **WASH**

- разведите концентрат **WS 5102** в соотношении 1+20 дистиллированной или деионизованной водой, например, 50 мл концентрата **WS 5102** + 1000 мл дистиллированной воды = 1050 мл.
- разведенный буфер стабилен в течение 60 дней при хранении при 15...25 °С.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотки

Не используйте сыворотки с сильным гемолизом или липемией.

Визуальный учет результатов

При отсутствии фотометра возможен визуальный учет результатов определения IgM антител к ВПГ, при этом должны быть соблюдены следующие условия:

- Лунка с бланком должна быть бесцветной на глаз.
- Проба считается положительной, если интенсивность ее окраски значительно превышает интенсивность окраски в лунках (B1/C1) с отрицательным контролем.

Примечание

Компоненты набора стабильны до окончания указанного срока годности даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента зависит от количества отборов реагентов. 60-дневный срок использования реагентов установлен из соображения надежности получения результатов.

При работе с набором следует обеспечить постоянное соблюдение в лаборатории основных требований GLP (надлежащей лабораторной практики).

Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы их собственными крышками немедленно после отбора реагентов; отбирать только необходимое количество реагента, если предполагается его соприкосновение с другими растворами, способными вызвать контаминацию, например образцами пациентов; как можно быстрее возвращать исходные реагенты, если они не используются, в стандартные условия хранения (2-8 °C). Всегда должно проверяться соблюдение условий достоверности результатов теста.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста HSV IgM фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/el-hsvm.pdf>

или

<http://www.human.de/data/gb/vr/el-hsvm.pdf>

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

«УТВЕРЖДАЮ»

Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

П.Г. Каленик

« 1 » июня 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**Набор реагентов для определения антител IgG к вирусу Варицелла-Зостер
(Varicella-Zoster Virus (VZV) IgG)
производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)****Опоясывающий герпес IgG (VZV IgG)**

Иммуноферментный тест для количественного определения антител класса IgG к вирусу опоясывающего герпеса в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

IVD

ВВЕДЕНИЕ

Вирус опоясывающего герпеса (*Varicella zoster virus*, VZV) известен в качестве этиологического фактора ветряной оспы у детей и опоясывающего герпеса у взрослых. Вирус поражает только человека. Ежегодно в мире регистрируется до 3 миллионов случаев ветряной оспы. Заболевание у детей характеризуется относительно легким течением и благоприятным прогнозом, основными клиническими симптомами являются лихорадка, недомогание и кожная сыпь. В более позднем возрасте ветряная оспа протекает тяжелее и нередко сопровождается пневмонией.

Опоясывающий герпес у взрослых также является распространенным заболеванием, по некоторым данным поражающим до 10% общей популяции.

Серологические исследования являются рутинной процедурой при диагностике опоясывающего герпеса и ветряной оспы, и, кроме того, могут применяться для наблюдения за развитием инфекции.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител класса IgG к вирусу опоясывающего герпеса (анти-ВОГ IgG) осуществляется классическим методом двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа. Антигенный материал (ВОГ АГ), выделенный из клеточной культуры, зараженной вирусом опоясывающего герпеса, адсорбирован на лунках микропланшета. На первой стадии инкубации анти-ВОГ IgG антитела, содержащиеся в контролях и исследуемых образцах, связываются с иммобилизованными ВОГ АГ. После промывки, удаляющей не связавшиеся компоненты сывороток, в лунки добавляется конъюгат, представляющий собой антитела к IgG человека, меченые пероксидазой хрена (HRP). В результате инкубации (стадия 2) конъюгат специфически связывается на поверхности лунок с антителами класса IgG, образуя типоспецифические иммунокомплексы. После повторной промывки, удаляющей не связавшийся конъюгат, в лунки вносится субстрат (стадия 3). Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом ТМБ приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет с синего на желтый после добавления стоп-реагента. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации в образце IgG антител к ВОГ и может быть измерена на микропланшетном фотометре с длиной волны 450 нм (например, HUMAREADER или ELISYS).

Результат интерпретируется, как положительный или отрицательный, при сравнении с расчетным значением уровня отсечения (cut-off), либо выражается в относительных единицах фирмы HUMAN (HU/мл) или Международных единицах ВОЗ (МЕд/мл), с расчетом по положительному контролю в качестве калибратора.

МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ И ИХ СОСТАВ

MC	Стрипы 8-луночные (код VZV G, в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, с иммобилизованным ВОГ антигеном, полученным методом культуры клеток.	12 шт.
NC	ВОГ - IgG отрицательный контроль (зеленая крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
PC	ВОГ - IgG положительный контроль (красная крышка) Готовый к использованию, предварительно разбавленный, на основе человеческой	1×2,5 мл

сыворотки; 20 мМЕд/мл $\pm$ 10%.

Откалиброван по Международному стандартному образцу ВОЗ
(соответствует 2 МЕд/мл в нативной сыворотке)

DIL-G 5121	Буфер для разведения IgG образцов (белая крышка) Готовый к использованию 0,01 М фосфатный буфер, <u>зеленого цвета</u> , содержит 8 г/л хлорида натрия и 10 г/л альбумина; pH 6,5 $\pm$ 0,2	1 $\times$ 100 мл
CON	Конъюгат анти-IgG (белая крышка) Готовый к использованию раствор кроличьих антител к IgG человека, меченых пероксидазой хрена, <u>красного цвета</u>	1 $\times$ 12 мл
WS 5102	Промывочный раствор (белая крышка) Концентрат (на 1000 мл готового раствора, содержащего 10 ммоль/л трис-солевого буфера и 8 г/л хлорида натрия, pH 7,2 $\pm$ 0,2)	1 $\times$ 50 мл
SUB 5103	Субстратный реагент (черная крышка) Готовый к использованию, бесцветный или светло-голубой, содержит 1,2 ммоль/л 3,3',5,5' тетраметилбензидина (ТМБ) и 3 ммоль/л перекиси водорода; pH 3,7 $\pm$ 0,2	1 $\times$ 13 мл
STOP 5104	Стоп-реагент (красная крышка) Готовый к использованию, содержит 0,5 М серную кислоту	1 $\times$ 15 мл
	Клейкая пленка для стрипов	2 шт.

- Общее содержание консервантов в реагентах составляет < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования. Избегайте контакта с кожей и слизистыми. Проверка контролей, входящих в состав набора, на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBsAg, дала отрицательный результат. В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) пользуйтесь защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

После исследования все материалы, контактировавшие с образцами пациентов или контролями, должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом).

Стоп-реагент **STOP** 5104 содержит серную кислоту, способную вызвать ожоги глаз, кожи и слизистых покровов. При контакте с этим реагентом тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, в условиях хранения при температуре 2-8 °С.

После вскрытия флаконов реагенты пригодны к использованию в течение 2 месяцев.

Стрипы **MIC** (код VZV G)

- Планшет, состоящий из 12 стрипов в рамке-держателе, запаян под вакуумом в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.
- Перед вскрытием упаковку с планшетом следует прогреть до комнатной температуры.
- Неиспользованные стрипы необходимо вернуть обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застежкой и хранить в таком виде при температуре 2-8 °С.

Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием дайте всем реагентам прогреться до **комнатной температуры** (15-25 °С). Неиспользуемые реагенты следует всегда хранить при температуре 2-8 °С.

Примечание: Реагенты общего назначения **DIL-G** 5121, **WS** 5102, **SUB** 5103 и **STOP** 5104 взаимозаменяемы между различными партиями (лотами) набора и различными наборами фирмы HUMAN. В ИФА тестах на IgG антитела используйте только IgG буфер для разведения образцов **DIL-G** 5121.

Все остальные реагенты специфичны к конкретной партии (лоту) набора и не могут быть заменены реагентами из другой партии. При работе с данным набором не допускается использование каких-либо реагентов других производителей.

Рабочий раствор промывочного буфера WASH

- Для получения рабочего раствора промывочного буфера разведите концентрат WS 5102 в соотношении 1+20 свежей дистиллированной водой (например: 50 мл концентрата WS 5102 + 1000 мл дистиллированной воды = 1050 мл).
- Стабильность: до 60 дней при температуре 15-25 °C.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**Сыворотки**

Не используйте образцы с сильным гемолизом или липемией.

Образцы могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8 °C, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20 °C. Допускается только однократное замораживание. Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите последние центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не смешивайте реагенты из разных партий наборов. Не путайте крышки от флаконов. Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера контролей и образцов в листок-формуляр, приложенный к оригиналу инструкции.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов MIC или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование контролей должно проводиться в дубликатах. Вносить образцы и контроли необходимо как можно ближе к дну лунки.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины образцов. Если для анализа используется больше одного планшета, контроли следует ставить с каждым из них.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Добавление рабочего раствора субстрата SUB инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента STOP. Во время развития окраски инкубируйте планшеты в темноте.

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок в 5% раствор гипохлорита натрия и внесите в них рабочий раствор промывочного буфера WASH. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку еще 3 раза.

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его рабочим раствором промывочного буфера WASH и промойте лунки 4 или 5 раз. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял лунки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости не должен превышать 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть прогреты до комнатной температуры.

Подготовка образцов:

Разведите сыворотки пациентов в соотношении 1+100 IgG буфером для разведения образцов DIL-G 5121. Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 1 мл буфера DIL-G 5121 и тщательно перемешайте.

Разведенные образцы до проведения анализа могут храниться в течение 48 часов при температуре 2-8 °C.

Контроли готовы к использованию и разведения не требуют.

Стадия 1 Внесите в лунки:	Лунка [объем жидкости в мкл]			
	A1 бланк	B1/C1 Отриц. контроль NC	D1/E1 Полож. контроль PC	F1... Образец
NC в две лунки	--	100	--	--
PC в две лунки	--	--	100	--
разведенные образцы	--	--	--	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 4 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 2				
Внесите в лунки:				
Конъюгат анти-IgG CON	--	100	100	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 5 раз, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 3				
Внесите в лунки:				
Субстратный реагент SUB 5103	100	100	100	100
Инкубируйте 15 минут при 17-25 °C (см. P8).				
Добавьте стоп-реагент STOP 5104	100	100	100	100
Тщательно перемешайте.				
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.				
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение не более чем 30 минут после остановки реакции) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм, используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.				

РАСЧЕТ КОНТРОЛЬНЫХ ВЕЛИЧИН И Cut-off

Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля NC в лунках B1 и C1 – (MNC) и положительного контроля PC в лунках D1 и E1 (MPC) рассчитывается по формулам:

$$MNC = \frac{ОП_{450}(B1) + ОП_{450}(C1)}{2} \quad MPC = \frac{ОП_{450}(D1) + ОП_{450}(E1)}{2}$$

Значение уровня отсечения, cut-off (COV), рассчитывается по формуле:

$$COV = MNC + (0,1 \times MPC)$$

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

1. ОП бланка в лунке A1 < 0,150
2. MNC ≤ 0,250
3. MPC ≥ 0,750
4. MPC : MNC ≥ 5

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой $\geq \text{COV} + 15\%$, результат считается **положительным по анти-ВОГ IgG**.
- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой $< \text{COV} - 15\%$, результат считается **отрицательным по анти-ВОГ IgG**.

В силу физиологической и аналитической изменчивости, значения, лежащие в пределах 15% диапазона по обе стороны cut-off, являются **неопределенными** (серая зона). Образцы, показавшие неопределенный результат, рекомендуется проанализировать повторно, параллельно со свежей сывороткой, взятой через 7-14 дней, ставя каждую из сывороток в дубликатах. При интерпретации изменения уровня специфических антител необходимо также учитывать анамнез и данные других исследований. Образцы, повторно давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать подтверждающим тестом.

Количественные результаты, отражающие изменение концентрации специфических IgG антител к ВОГ, следует интерпретировать с осторожностью.

При отсутствии фотометра возможен визуальный учет результатов, при этом необходимо соблюдение следующих условий:

- Лунка А1 с бланком должна быть бесцветной на глаз.
- Образец считается положительным, если окраска лунки с образцом явно интенсивнее, чем окраска лунок В1/С1 с отрицательным контролем **NC**.

Расчет концентрации анти-ВОГ IgG антител в единицах HUMAN или единицах ВОЗ

Положительные результаты определения IgG к ВОГ могут быть рассчитаны в относительных единицах фирмы HUMAN (НУ/мл) или в Международных единицах ВОЗ (МЕд/мл):

$$\text{НУ/мл} = \frac{\text{ОП}_{\text{образца}}}{\text{МРС}} \times 100$$

или

$$\text{МЕд/мл (ВОЗ)} = \frac{\text{ОП}_{\text{образца}}}{\text{МРС}} \times 2,0$$

где ОП_{образца} - среднее значение оптической плотности ОП₄₅₀ в лунках с образцом;

МРС - среднее значение оптической плотности ОП₄₅₀ в лунках с положительным контролем.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста VZV IgG фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/EL-VZVG.pdf> или

<http://www.human.de/data/gb/vr/EL-VZVG.pdf>

Примечание

Компоненты набора стабильны до окончания указанного срока годности даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента зависит от количества отборов реагентов. 60-дневный срок использования реагентов установлен из соображения надежности получения результатов.

При работе с набором следует обеспечить постоянное соблюдение в лаборатории основных требований GLP (надлежащей лабораторной практики).

Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы их собственными крышками немедленно после отбора реагентов; отбирать только необходимое количество реагента, если предполагается его соприкосновение с другими растворами, способными вызвать контаминацию, например образцами пациентов; как можно быстрее возвращать исходные реагенты, если они не используются, в стандартные условия хранения (2-8 °C).

Всегда должно проверяться соблюдение условий достоверности результатов теста.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции

К.И. Бланк

«УТВЕРЖДАЮ»

Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»П.Г. Каленик
« 1 » июня 2009 г.**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ****Набор реагентов для определения антител IgM к вирусу Варицелла-Зостер
(Varicella-Zoster Virus (VZV) IgM)
производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)****Опоясывающий герпес IgM (VZV IgM)**

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgM к вирусу опоясывающего герпеса в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

IVD

ВВЕДЕНИЕ

Вирус опоясывающего герпеса (*Varicella zoster virus*, VZV) является возбудителем ветряной оспы у детей и опоясывающего герпеса у взрослых. Вирус поражает только человека. Ежегодно в мире регистрируется до 3 миллионов случаев ветряной оспы. Заболевание у детей характеризуется относительно легким течением и благоприятным прогнозом, основными клиническими симптомами являются лихорадка, недомогание и кожная сыпь. В более старшем возрасте ветряная оспа протекает тяжелее и нередко сопровождается пневмонией.

Опоясывающий герпес у взрослых также является распространенным заболеванием, по некоторым данным поражающим до 10% общей популяции.

Серологические исследования являются рутинной процедурой при диагностике опоясывающего герпеса и ветряной оспы, и, кроме того, могут применяться для мониторинга течения инфекции.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител класса IgM к вирусу опоясывающего герпеса (анти-ВОГ IgM) осуществляется классическим методом двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа. Антигенный материал, выделенный из клеточной культуры, зараженной вирусом опоясывающего герпеса (ВОГ), адсорбирован на лунках микропланшета. На первой стадии инкубации антитела к ВОГ, содержащиеся в контролях и исследуемых образцах, связываются с иммобилизованными антигенами (ВОГ АГ). После промывки, удаляющей не связавшиеся компоненты сывороток, в лунки добавляется конъюгат, представляющий собой антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена (HRP). В результате инкубации (стадия 2) конъюгат специфически связывается на поверхности лунок с антителами класса IgM, образуя типоспецифические иммунные комплексы. Для устранения влияния ревматоидного фактора и конкуренции с IgG антителами, буфер для разведения образцов содержит антитела к IgG человека.

После повторной промывки, удаляющей не связавшийся конъюгат, в лунки вносится субстрат (стадия 3). Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом ТМБ приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет с синего на желтый после добавления стоп-реагента. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации анти-ВОГ IgM антител в образце и может быть измерена на микропланшетном фотометре с длиной волны 450 нм (например, приборы линии HUMAREADER или ELISYS производства фирмы HUMAN). Результат интерпретируется как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением уровня отсечения cut-off.

МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ И ИХ СОСТАВ

MIC	Стрипы 8-луночные (код VZV M, в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, с иммобилизованным ВОГ антигеном, полученным методом культуры клеток; в упаковке с влагопоглотителем	12 шт.
NC	ВОГ-IgM отрицательный контроль (зеленая крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
PC	ВОГ-IgM положительный контроль (красная крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
DIL-M 5111	IgM буфер для разведения образцов (синяя крышка) Готовый к использованию 0,01 М фосфатный буфер, <u>зеленого цвета</u> ; содержит 8 г/л хлорида натрия, 10 г/л альбумина и козы антитела к IgG человека; pH 6,5±0,2	1×100 мл
CON	Конъюгат анти-IgM (белая крышка)	1×12 мл

Готовый к использованию раствор кроличьих антител к IgM человека, меченых пероксидазой хрена, красного цвета

WS 5102	Промывочный раствор (белая крышка) Концентрат (на 1000 мл готового раствора, содержащего 10 ммоль/л трис-солевого буфера и 8 г/л хлорида натрия; pH 7,2±0,2)	1×50 мл
SUB 5103	Субстратный реагент (черная крышка) Готовый к использованию, бесцветный или светло-голубой, содержит 1,2 ммоль/л 3,3',5,5' тетраметилбензидина (ТМБ) и 3 ммоль/л перекиси водорода	1×13 мл
STOP 5104	Стоп-реагент (красная крышка) Готовый к использованию, содержит 0,5M серную кислоту	1×15 мл
	Клейкая пленка для стрипов	2 шт.

- Общее содержание консервантов в реагентах составляет < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования. Избегайте контакта с кожей и слизистыми. Обращайтесь со всеми образцами и контролями как с потенциально инфекционными материалами. Проверка (на уровне доноров) контролей, входящих в состав набора, на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBsAg, дала отрицательный результат. В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) пользуйтесь защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

После исследования все материалы, контактировавшие с образцами пациентов или контролями, должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °C, замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом).

Стоп-реагент **STOP** содержит серную кислоту, способную вызвать ожоги глаз, кожи и слизистых покровов. При контакте с этим реагентом тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, при хранении при 2-8 °C.

После вскрытия флаконов реагенты следует хранить при температуре 2-8°C; они пригодны к использованию в течение 60 дней (см. также раздел ПРИМЕЧАНИЕ).

Стрипы **MIC** (код VZV M)

- Планшет, состоящий из 12 стрипов в рамке-держателе, запаян под вакуумом в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.
 - Перед вскрытием упаковку с планшетом следует прогреть до комнатной температуры.
 - Неиспользованные стрипы необходимо вернуть обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застёжкой и хранить в таком виде при температуре 2-8 °C.
- Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием дайте всем реагентам прогреться до **комнатной температуры**. (15-25 °C). Неиспользуемые реагенты следует всегда хранить при температуре 2-8 °C.

Примечание: Реагенты общего назначения **DIL-M 5111**, **WS 5102**, **SUB 5103** и **STOP 5104** взаимозаменяемы между различными партиями (лотами) набора и различными наборами фирмы HUMAN. В ИФА тестах на IgM антитела используйте только IgM буфер для разведения образцов **DIL-M 5111**.

Все остальные реагенты специфичны к конкретной партии (лоту) набора и не могут быть заменены реагентами из другой партии. При работе с данным набором не допускается использование каких-либо реагентов других производителей.

Рабочий промывочный раствор **WASH**

- Для получения рабочего промывочного раствора разведите концентрат **WS 5102** в соотношении 1+20 свежей деионизированной водой (например: 50 мл концентрата **WS 5102** + 1000 мл деионизированной воды = 1050 мл).
- Стабильность: в течение 60 дней при 2-8 °C.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотки

Не используйте сыворотки с сильным гемолизом или липемией.

Нативные сыворотки могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8 °С, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20 °С. Допускается только однократное замораживание. Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите последние центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не смешивайте реагенты из разных партий наборов. Не путайте крышки от флаконов, чтобы избежать риска контаминации. Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера образцов и контролей в листок-формуляр, приложенный к набору.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов **MIC** или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование контролей должно проводиться в дубликатах. Вносить образцы и контроли необходимо как можно ближе к дну лунки.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования образцов не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины образцов. Если для анализа используется больше одного планшета, контроли следует выполнять на каждом планшете.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Добавление рабочего раствора субстрата **SUB** инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента **STOP**. Во время развития окраски инкубируйте планшеты в темноте.

P9: Помутнение буфера для разведения образцов **DIL-M** после добавления в него образца не влияет на результаты исследования.

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и ложному завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок в 5% раствор гипохлорита натрия и внесите в них рабочий раствор промывочного буфера **WASH**. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку еще 3 раза (всего 4 цикла).

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его рабочим раствором промывочного буфера **WASH** и промойте лунки еще 4 раза (всего 5 раз). Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял лунки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости должен быть менее 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть прогреты до комнатной температуры.

Подготовка образцов:

Разведите сыворотки пациентов в соотношении 1+100 IgM буфером для разведения образцов **DIL-M** 5111. Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 1 мл буфера **DIL-M** 5111 и тщательно перемешайте (см. P9).

Прежде, чем продолжать исследование, **разведенные образцы необходимо выдержать, как минимум, 5 минут при комнатной температуре**.

Разведенные образцы до проведения анализа могут храниться в течение 24 часов при температуре 2-8 °С.

Контроли готовы к использованию и разведения не требуют.

Стадия 1 Внесите в лунки:	Лунка [объем жидкости в мкл]			
	A1 бланк	B1/C1 Отриц. контроль NC	D1/E1 Полож. контроль PC	F1... Образец
NC в две лунки	--	100	--	--
PC в две лунки	--	--	100	--
Разведенные образцы	--	--	--	100

Закройте стрипы **MIC** клейкой пленкой

Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 4 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 2				
Внесите в лунки:				
Конъюгат анти-IgM CON	--	100	100	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 5 раз, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 3				
Внесите в лунки:				
Субстратный реагент SUB 5103	100	100	100	100
Инкубируйте 15 минут при 17-25 °C (см. P8).				
Добавьте стоп-реагент STOP 5104	100	100	100	100
Тщательно перемешайте.				
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.				
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение <u>не более чем 30 минут</u>) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм , используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.				

РАСЧЕТ КОНТРОЛЬНЫХ ВЕЛИЧИН И Cut-off

Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля **NC** в лунках B1 и C1 – (**MNC**) и положительного контроля **PC** в лунках D1 и E1 (**MPC**) рассчитывается по формулам:

$$MNC = \frac{ОП_{450}(B1) + ОП_{450}(C1)}{2}; \quad MPC = \frac{ОП_{450}(D1) + ОП_{450}(E1)}{2}$$

Значение уровня отсечения, cut-off (**COV**), рассчитывается по формуле:

$$COV = MNC + (0,2 \times MPC)$$

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

1. ОП бланка в лунке A1 < 0,150
2. MNC ≤ 0,250
3. MPC ≥ 0,400
4. MPC : MNC ≥ 3

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой ≥ **COV + 15%**, результат считается **положительным по анти-ВОГ IgM**.
- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой < **COV - 15%**, результат считается **отрицательным по анти-ВОГ IgM**.

В силу физиологической и аналитической изменчивости, значения, лежащие в пределах 15% диапазона по обе стороны cut-off, являются **неопределенными** (серая зона). Образцы, показавшие неопределенный результат, рекомендуется проанализировать повторно, параллельно со свежей сывороткой, взятой через 7-14 дней, ставя каждую из сывороток в дубликатах. При интерпретации результатов IgM теста необходимо также учитывать тенденцию изменения уровня специфических антител, в том числе и антител класса IgG (для этого можно использовать тест HUMAN ELISA IgG), равно как анамнез и данные других исследований. Образцы, повторно давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать подтверждающим тестом.

Повышенный уровень IgM к вирусу опоясывающего герпеса может наблюдаться при инфекциях, вызванных другими герпесвирусами. Это может быть вызвано перекрестной реактивностью между ВОГ и вирусом простого герпеса, а также возможной реактивацией вирусом Эпштейна-Барра латентно протекающей ВОГ.

инфекции. Для правильной интерпретации результатов исследования следует исключить наличие таких факторов.

Визуальный учет результатов

При отсутствии фотометра возможен визуальный учет результатов, при этом необходимо соблюдение следующих условий:

- Лунка с бланком должна быть бесцветной на глаз.
- Проба считается положительной, если ее окраска явно интенсивнее, чем окраска в лунках с отрицательным контролем (B1/C1).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста VZV IgM фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/EL-VZVM.pdf> или
<http://www.human-de.com/data/gb/vr/EL-VZVM.pdf>

Примечание

Компоненты набора стабильны до окончания указанного срока годности даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента зависит от количества отборов реагентов. 60-дневный срок использования реагентов установлен из соображения надежности получения результатов.

При работе с набором следует обеспечить постоянное соблюдение в лаборатории основных требований GLP (надлежащей лабораторной практики).

Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы их собственными крышками немедленно после отбора реагентов; отбирать только необходимое количество реагента, если предполагается его соприкосновение с другими растворами, способными вызвать контаминацию, например образцами пациентов; как можно быстрее возвращать исходные реагенты, если они не используются, в стандартные условия хранения (2-8 °C).

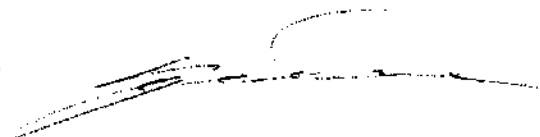
Всегда должно проверяться соблюдение условий достоверности результатов теста.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

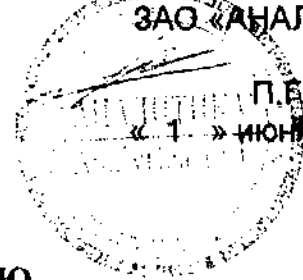
Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

«УТВЕРЖДАЮ»
Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»



П.Б. Каленик
« 1 » июня 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для определения антител IgG к вирусу Эпштейна-Барр
(Epstein-Barr Virus (EBV) IgG)
производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)**

Вирус Эпштейна-Барр IgG (EBV IgG)

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgG к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

IVD

ВВЕДЕНИЕ

Инфекция, вызываемая вирусом Эпштейна-Барр (*Epstein-Barr Virus*, ВЭБ), широко распространена и передается преимущественно через слюну. По истечении инкубационного периода, продолжающегося обычно 1-2 месяца, развиваются клинические симптомы заболевания. Одним из частых клинических синдромов ВЭБ-инфекции является инфекционный мононуклеоз, характеризующийся наличием «классической триады»: лихорадкой, болью в горле и лимфаденопатией. Токсоплазмоз и цитомегаловирусная инфекция могут вызывать похожие клинические синдромы, поэтому при постановке диагноза необходимо лабораторное подтверждение этиологии заболевания.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест основан на методе двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа. Антигенный материал, представляющий собой дериват клеточной культуры, зараженной ВЭБ, адсорбирован на лунках микропланшета. При внесении в лунки контролей и проб, находящиеся в них антитела к ВЭБ, связываются с иммобилизованным антигеном. После промывки, удаляющей не связавшиеся компоненты сывороток, в лунки добавляется конъюгат, представляющий собой антитела к IgG человека, меченые пероксидазой хрена (HRP). В результате инкубации на поверхности лунок образуется комплекс:

Антиген ВЭБ ↔ анти-ВЭБ - IgG ↔ анти-IgG антитела - HRP

После повторной промывки, удаляющей не связавшийся конъюгат, в лунки вносится субстрат. Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом ТМБ приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна уровню IgG к ВЭБ в пробе и может быть измерена на микропланшетном фотометре с длиной волны 450 нм (например, HUMAREADER).

Результат интерпретируется как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением уровня отсека *cut-off*, или рассчитывается в специальных единицах фирмы HUMAN (HU/мл) с использованием положительного контроля в качестве калибратора.

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Набор содержит реагенты, достаточные для выполнения 96 определений:

MIC	Стрипы 8-луночные (код EBV G, в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, с иммобилизованным капсидным антигеном ВЭБ; в упаковке с влагопоглотителем	12
NC	ВЭБ IgG отрицательный контроль (зеленая крышка) Готов к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
PC	ВЭБ IgG положительный контроль (красная крышка) Готов к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
DIL-G 5121	Буфер для разведения IgG образцов (белая крышка) Готов к использованию 0,01 М фосфатный буфер, <u>зеленого цвета</u> ; содержит 8 г/л хлорида натрия и 10 г/л альбумина; pH 6,5±0,2	1×100 мл
CON	Конъюгат анти-IgG (белая крышка)	1×12 мл

Готов к использованию раствор антител кролика к IgG человека, меченых пероксидазой хрена, красного цвета

WS 5102	Промывочный раствор (белая крышка) Концентрат (на 1000 мл готового раствора, содержащего 10 ммоль/л трис-солевого буфера и 8 г/л хлорида натрия; pH 7,2±0,2)	1×50 мл
SUB 5103	Субстратный реагент (черная крышка) Готов к использованию, бесцветный или голубоватый; содержит 1,2 ммоль/л 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и 3 ммоль/л перекиси водорода; pH 3,7±0,2	1×13 мл
STOP 5104	Стоп-реагент (красная крышка) Готов к использованию, содержит 0,5М серную кислоту	1×15 мл
	Пленка для заклейки стрипов	2

- Общее содержание консервантов в реагентах составляет < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования.
2. Избегайте контакта реагентов и проб с кожей и слизистыми.
3. Пользуйтесь специальной одеждой и одноразовыми перчатками.
4. Контроли, входящие в состав набора, проверены на отсутствие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBs-антигена, тем не менее обращаться с контролями и пробами пациентов надлежит как с потенциально инфицированными материалами.
5. После исследования все материалы, контактировавшие с исследуемыми пробами или калибраторами, должны быть подвергнуты дезактивации автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, или замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа.
6. Стоп-реагент **STOP** содержит серную кислоту, способную вызвать ожоги глаз и кожи. При попадании этого реагента на кожный покров и слизистые тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, в условиях хранения при температуре 2-8 °С.

После вскрытия флаконов реагенты пригодны к использованию в течение 2 месяцев при хранении при температуре 2-8 °С.

Стрипы **MIC** (код EBV G)

Микропланшет, состоящий из 12 стрипов в рамке-держателе, запаян под вакуумом в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем. Перед вскрытием вакуумной упаковки микропланшет следует прогреть до комнатной температуры. Неиспользованные стрипы необходимо положить обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застежкой и хранить в таком виде при температуре 2-8 °С. Убедитесь, что в пакете со стрипами остался влагопоглотитель.

Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Примечание: Реагенты общего назначения **DIL-G 5121**, **WS 5102**, **SUB 5103** и **STOP 5104** взаимозаменяемы между различными партиями (лотами) набора и различными наборами фирмы HUMAN. В ИФА тестах на IgG антитела используйте только IgG буфер для разведения образцов **DIL-G 5121**.

Все остальные реагенты **специфичны к конкретной партии (лоту)** набора и не могут быть заменены реагентами из другой партии. При работе с данным набором не допускается использование каких-либо реагентов других производителей.

Промывочный буфер **WASH**

Для получения рабочего раствора промывочного буфера разведите концентрат **WS 5102** в соотношении 1+20 дистиллированной или деионизованной водой (например: 50 мл концентрата **WS 5102** + 1000 мл дистиллированной воды = 1050 мл).

Стабильность: до 60 дней при температуре 15-25 °С.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотки

Не используйте сыворотки с сильным гемолизом или липемией.

Нативные сыворотки могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8 °С, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20 °С. Допускается **только однократное замораживание**. Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите их центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не путайте крышки от флаконов. Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера контролей и проб в листок-формуляр, приложенный к оригиналу инструкции.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов **MIC** или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель. Исследование контролей должно проводиться в дубликатах.

P5: Вносить пробы и контроли необходимо как можно ближе к дну лунки.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины проб. Если для анализа используется больше одного микропланшета, контроли следует ставить с каждым из них.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Инкубацию с субстратом проводят в темноте. Добавление рабочего раствора субстрата **SUB** инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента **STOP**.

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок и внесите в них промывочный буфер **WASH**. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку еще 3 раза.

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его промывочным буфером **WASH** и промойте лунки 4 или 5 раз. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял ячейки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости должен быть менее 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым микропланшетом (стрипом) о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть прогреты до комнатной температуры.

Подготовка образцов:

Разведите сыворотки пациентов в соотношении **1+20** IgG буфером для разведения образцов **DIL-G 5121**. Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 0,2 мл буфера **DIL-G 5121** и тщательно перемешайте.

Разведенные образцы до проведения анализа могут храниться в течение 48 часов при температуре 2-8 °C.

Контроли готовы к использованию и разведения не требуют.

Стадия 1	Лунка [объем жидкости в мкл]			
	A1 бланк	B1/C1 Отриц. контроль NC	D1/E1 Полож. контроль PC	F1... Образец
Внесите в лунки:				
NC в две лунки	--	100	--	--
PC в две лунки	--	--	100	--
Разведенный образец	--	--	--	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 60 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 4 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 2				
Внесите в лунки:				
Конъюгат анти-IgG CON	--	100	100	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 5 раз, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350

Стадия 3					
Внесите в лунки:					
Субстратный реагент SUB 5103		100	100	100	100
Инкубируйте 15 минут при 17-25 °C в темноте (см. P8).					
Добавьте стоп-реагент STOP 5104		100	100	100	100
Тщательно перемешайте.					
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.					
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение <u>не более чем 30 минут</u>) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм , используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.					

РАСЧЕТ КОНТРОЛЬНЫХ ВЕЛИЧИН И Cut-off

Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля **NC** в лунках B1 и C1 – (**MNC**) и положительного контроля **PC** в лунках D1 и E1 (**MPC**) рассчитывается по формулам:

$$MNC = \frac{ОП_{450}(B1) + ОП_{450}(C1)}{2} \quad MPC = \frac{ОП_{450}(D1) + ОП_{450}(E1)}{2}$$

Значение уровня отсечения, cut-off (COV), рассчитывается по формуле:

$$COV = MNC + 0,1 \times MPC$$

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

1. ОП бланка в лунке A1 < 0,150
2. MNC ≤ 0,250
3. MPC ≥ 0,750
4. MPC : MNC ≥ 5

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Если оптическая плотность в лунке с исследуемой сывороткой больше или равна значению cut-off **+15%**, результат считается **положительным**.
- Если оптическая плотность в лунке с исследуемой сывороткой меньше значения cut-off **-15%**, результат считается **отрицательным**.

В силу физиологической и аналитической изменчивости, значения, лежащие в пределах 15% диапазона по обе стороны cut-off, являются **неопределенными** (серая зона). Образцы, показавшие неопределенный результат, рекомендуется проанализировать повторно, параллельно со свежей сывороткой, взятой через 7-14 дней. При интерпретации результатов IgG теста необходимо учитывать также тенденцию изменения уровня специфических антител, равно как анамнез и данные других исследований. Положительные пробы, а также пробы, повторно давшие неопределенный результат, необходимо исследовать подтверждающим тестом.

Результаты, отражающие изменение концентрации IgG антител к ВЭБ, следует интерпретировать с осторожностью.

Визуальный учет результатов

При отсутствии фотометра возможен визуальный учет результатов определения IgG антител к ВЭБ, при этом должны быть соблюдены следующие условия:

- Лунка A1 с бланком должна быть бесцветной на глаз.
- Образец считается положительным, если окраска лунки с образцом явно интенсивнее, чем окраска лунок B1/C1 с отрицательным контролем **NC**.

Расчет в единицах HUMAN

Положительные результаты EBV IgG теста могут быть выражены в специальных единицах фирмы HUMAN (HU/мл):

$$HU/мл = \frac{ОП_{образца}}{MPC} \times 100$$

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста EBV IgG фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/el-ebvg.pdf> или
<http://www.human-de.com/data/gb/vr/el-ebvg.pdf>

Примечание

Компоненты набора стабильны до окончания указанного срока годности даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента зависит от количества отборов реагентов. 60-дневный срок использования реагентов установлен из соображений надежности получения результатов.

При работе с набором следует обеспечить постоянное соблюдение в лаборатории основных требований GLP (надлежащей лабораторной практики).

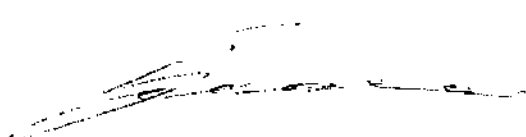
Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы их собственными крышками немедленно после отбора реагентов; отбирать только необходимое количество реагента, если предполагается его соприкосновение с другими растворами, способными вызвать контаминацию, например образцами пациентов; как можно быстрее возвращать исходные реагенты, если они не используются, в стандартные условия хранения (2-8 °C). Всегда должно проверяться соблюдение условий достоверности результатов теста.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

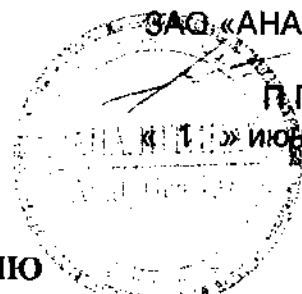
Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

«УТВЕРЖДАЮ»
Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»



П. Г. Каленик
10 июня 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения антител IgM к вирусу Эпштейна-Барр
(Epstein-Barr Virus (EBV) IgM)
производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)

Вирус Эпштейна-Барр IgM (EBV IgM)

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgM к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений



ВВЕДЕНИЕ

Тест анти-ВЭБ IgM предназначен для определения иммуноглобулинов класса М (IgM) к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) в сыворотке крови человека. Капсидный антиген является главным иммуногеном при развитии первичной ВЭБ-инфекции. Инфекция, вызываемая вирусом Эпштейна-Барр, широко распространена и передается преимущественно через слюну. После инкубационного периода, продолжающегося обычно 1-2 месяца, развиваются клинические симптомы заболевания. Одним из частых клинических синдромов ВЭБ-инфекции является инфекционный мононуклеоз, характеризующийся наличием «классической триады»: лихорадки, боли в горле и лимфаденопатии. Во многих случаях при подозрении на инфекционный мононуклеоз клиницист должен учитывать результаты лабораторных исследований, так как при токсоплазмозе и цитомегаловирусной инфекции клинические признаки могут быть схожими.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител класса IgM к вирусу Эпштейна-Барр (анти-ВЭБ IgM) осуществляется методом двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа по типу "сэндвич". Лунки микропланшета, являющиеся твердой фазой, покрыты капсидным антигеном (ВЭБ-АГ), полученным из клеточной культуры, зараженной ВЭБ. Связь антигена с поверхностью лунок осуществляется за счет адсорбированных специфических моноклональных антител. Промежуточный слой моноклональных антител обеспечивает высокую концентрацию антигена на поверхности лунок.

На первой стадии инкубации анти-ВЭБ антитела, присутствующие в исследуемых образцах или контролях, связываются в лунках с иммобилизованным на твердой фазе антигеном (ВЭБ-АГ). Для устранения влияния ревматоидного фактора и конкуренции с IgG антителами, буфер для разведения образцов содержит антитела к IgG человека.

В конце инкубации не связавшиеся компоненты сывороток удаляют при промывке. Для второй стадии инкубации в лунки добавляют конъюгат (антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена), который специфически связывается с антителами класса IgM, в результате на поверхности лунок образуются иммунные комплексы IgM-типа.

После повторной промывки, удаляющей избыток конъюгата, в лунки вносится субстрат/ТМБ (стадия 3). Ферментативная реакция приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет с синего на желтый после добавления стоп-реагента. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации анти-ВЭБ IgM антител в исследуемом образце.

Величину оптической плотности в лунках с калибраторами и образцами измеряют на фотометре для планшетов (например, HUMAREADER), снабженном фильтром для длины волны 450 нм. Результат интерпретируют, как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением уровня отсеечения (cut-off).

МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ И ИХ СОСТАВ



Стрипы 8-луночные (код EBV M, в рамке-держателе)

12 шт.

Стрипы, разделяемые на отдельные лунки,
с иммобилизованными моноклональными антителами мыши и капсидным ВЭБ
антигеном, полученным методом культуры клеток;
в упаковке с влагопоглотителем

NC	ВЭБ IgM отрицательный контроль (зеленая крышка) Готов к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
PC	ВЭБ IgM положительный контроль (красная крышка) Готов к использованию, на основе человеческой сыворотки;	1×2,5 мл
DIL-M 5111	IgM буфер для разведения образцов (синяя крышка) Готов к использованию, 0,01 М фосфатный буфер, <u>зеленого цвета</u> ; содержит 8 г/л хлорида натрия, 10 г/л альбумина и антитела козы к IgG человека; pH 6,5±0,2	1×100 мл
CON	Конъюгат анти-IgM (белая крышка) Готов к использованию, раствор антител кролика к IgM человека, меченных пероксидазой хрена, <u>красного цвета</u>	1×12 мл
WS 5102	Промывочный раствор (белая крышка) Концентрат (на 1000 мл готового раствора, содержащего 10 ммоль/л трис-солевого буфера и 8 г/л хлорида натрия; pH 7,2±0,2)	1×50 мл
SUB 5103	Субстратный реагент (черная крышка) Готов к использованию, бесцветный или светло-голубой, содержит 1,2 ммоль/л 3,3',5,5' тетраметилбензидина (ТМБ) и 3 ммоль/л перекиси водорода; pH 3,7±0,2	1×13 мл
STOP 5104	Стоп-реагент (красная крышка) Готов к использованию, содержит 0,5М серную кислоту	1×15 мл
	Клейкая пленка для стрипов	2 шт.

- Общее содержание консервантов в реагентах составляет < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования. Избегайте контакта с кожей и слизистыми. Проверка контролей, входящих в состав набора, на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBsAg, дала отрицательный результат. В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) пользуйтесь защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

После исследования все материалы, контактировавшие с образцами пациентов или контролями, должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом).

Стоп-реагент **STOP** 5104 содержит серную кислоту, способную вызвать ожоги глаз, кожи и слизистых покровов. При контакте с этим реагентом тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, в условиях хранения при температуре 2-8 °С.

После вскрытия флаконов реагенты пригодны к использованию в течение 2 месяцев при условии хранения при температуре 2-8 °С.

Стрипы **MIC** (код EBV M)

- Планшет, состоящий из 12 стрипов в рамке-держателе, запаян под вакуумом в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.
 - Перед вскрытием упаковку с планшетом следует прогреть до комнатной температуры.
 - Неиспользованные стрипы необходимо вернуть обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застежкой и хранить в таком виде при температуре 2-8 °С.
- Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием прогрейте все реагенты до **комнатной температуры**. (15-25 °С). Неиспользуемые реагенты следует всегда хранить при температуре 2-8 °С.

Примечание: Реагенты общего назначения **DIL-M** 5111, **WS** 5102, **SUB** 5103 и **STOP** 5104 взаимозаменяемы между различными партиями (лотами) набора и различными наборами фирмы HUMAN. В ИФА тестах на **IgM** антитела используйте только IgM буфер для разведения образцов **DIL-M** 5111.

Все остальные реагенты **специфичны к конкретной партии (лоту)** набора и не могут быть заменены реагентами из другой партии. При работе с данным набором не допускается использование каких-либо реагентов других производителей.

Рабочий раствор промывочного буфера **WASH**

- Для получения рабочего раствора промывочного буфера разведите концентрат **WS 5102** в соотношении 1+20 свежей дистиллированной водой (например: 50 мл концентрата **WS 5102** + 1000 мл дистиллированной воды = 1050 мл).
- Рабочий раствор промывочного буфера стабилен в течение **60 дней при температуре 15-25 °C**.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотки

Не используйте сыворотки с сильным гемолизом или липемией.

Нативные сыворотки могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8 °C, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20 °C. Допускается только однократное замораживание. Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите последние центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не смешивайте реагенты из разных партий наборов. Не путайте крышки от флаконов. Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера контролей и проб в листок-формуляр, приложенный к оригиналу инструкции.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов **MIC** или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование контролей должно проводиться в **дубликатах**. Вносить пробы и контроли необходимо **как можно ближе ко дну лунки**.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины проб. Если для анализа используется больше одного планшета, контроли следует ставить с каждым из них.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Добавление рабочего раствора субстрата **SUB** инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента **STOP**. Во время развития окраски инкубируйте планшеты в темноте.

P9: Помутнение буфера для разведения образцов **DIL-M** после добавления в него образца не влияет на результаты исследования.

Методика промывки

Промывка лунок является **исключительно важной стадией**. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок в 5% раствор гипохлорита натрия и внесите в них рабочий раствор промывочного буфера **WASH**. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку еще 3 раза.

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его рабочим раствором промывочного буфера **WASH** и промойте лунки 4 или 5 раз. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял лунки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости должен быть менее 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры.

Подготовка образцов:

Разведите сыворотки пациентов в соотношении 1+100 буфером для разведения образцов **DIL-M 5111**. Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 1 мл буфера **DIL-M 5111** и тщательно перемешайте (см. P9).

Прежде, чем продолжать исследование, **разведенные сыворотки необходимо выдержать, как минимум, 5 минут при комнатной температуре.**

Разведенные образцы до проведения анализа могут храниться в течение 24 часов при температуре 2-8 °C.

Контроли готовы к использованию и **разведения не требуют.**

Стадия 1 Внесите в лунки:	Лунка [объем жидкости в мкл]			
	A1 бланк	B1/C1 Отриц. контроль NC	D1/E1 Полож. контроль PC	F1... Образец
NC в две лунки	--	100	--	--
PC в две лунки	--	--	100	--
Разведенный образец	--	--	--	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 4 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 2				
Внесите в лунки:				
Конъюгат анти-IgM CON	--	100	100	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 5 раз, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 3				
Внесите в лунки:				
Субстратный реагент SUB 5103	100	100	100	100
Инкубируйте 15 минут при 17-25 °C в темноте (см. P8).				
Добавьте стоп-реагент STOP 5104	100	100	100	100
Тщательно перемешайте.				
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.				
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение не более чем 30 минут) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм , используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм .				

РАСЧЕТ КОНТРОЛЬНЫХ ВЕЛИЧИН И Cut-off

Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля **NC** в лунках B1 и C1 – (MNC) и положительного контроля **PC** в лунках D1 и E1 (MPC) рассчитывается по формулам:

$$MNC = \frac{ОП_{450}(B1) + ОП_{450}(C1)}{2}; \quad MPC = \frac{ОП_{450}(D1) + ОП_{450}(E1)}{2}$$

Уровень отсечения (cut-off или COV) рассчитывается по формуле:

$$cut-off = MNC + (0,2 \times MPC)$$

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

1. ОП бланка в лунке A1 < 0,150
2. MNC ≤ 0,250
3. MPC ≥ 0,400
4. MPC : MNC ≥ 3

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой $\geq \text{COV} + 15\%$, результат считается **положительным по анти-ВЭБ IgM**.
- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой $< \text{COV} - 15\%$, результат считается **отрицательным по анти-ВЭБ IgM**.

В силу физиологической и аналитической изменчивости, значения, лежащие в пределах 15% диапазона по обе стороны cut-off, являются **неопределенными** (серая зона). Образцы, показавшие неопределенный результат, рекомендуется проанализировать повторно, параллельно со свежей сывороткой, взятой через 7-14 дней, ставя каждую из сывороток в дубликатах. При интерпретации результатов IgM теста необходимо также учитывать тенденцию изменения уровня специфических антител, в том числе и антител класса IgG (для этого можно использовать тест HUMAN ELISA IgG), равно как анамнез и данные других исследований. Образцы, повторно давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать подтверждающим тестом.

Повышенный уровень IgM к вирусу Эпштейна-Барр может наблюдаться у больных с цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекцией. Это может быть вызвано реактивацией латентной ВЭБ инфекции. Для правильной интерпретации результатов исследования следует исключить наличие у пациента ЦМВ инфекции.

При отсутствии фотометра возможен визуальный учет результатов, при этом необходимо соблюдение следующих условий:

- Лунка A1 с бланком должна быть бесцветной на глаз.
- Образец считается положительным, если окраска лунки с образцом явно интенсивнее, чем окраска лунок B1/C1 с отрицательным контролем **NC**.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста EBV IgM фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/el-ebvm.pdf> или
<http://www.human-de.com/data/gb/vr/el-ebvm.pdf>

ПРИМЕЧАНИЕ

Набор предназначен только для *in vitro* диагностики.

Компоненты набора пригодны к использованию до окончания срока хранения, указанного на упаковке, даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента непосредственно зависит от количества анализируемых образцов. Гарантийный срок в течение 60 дней с момента первого использования компонентов установлен в целях предосторожности.

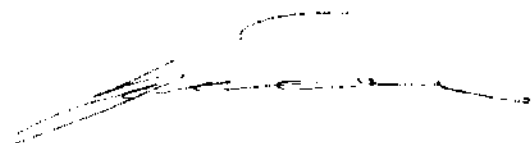
Использовать реагенты следует с соблюдением требований GLP (good laboratory practices). Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы немедленно после отбора реагентов; не возвращать во флакон отобранный реагент, если он соприкасался с поверхностями или другими растворами, способными вызвать контаминацию; как можно быстрее возвращать реагенты в стандартные условия хранения (2-8 °C). Строго соблюдать критерии валидации!

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

«УТВЕРЖДАЮ»

Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»П.Г. Каленик
« 1 » июня 2009 г.**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ****Набор реагентов для определения антител IgG к вирусу паротита (Mumps IgG)
производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)****Паротит IgG (MUMPS IgG)**

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgG к вирусу паротита в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

**ВВЕДЕНИЕ**

Эпидемический паротит, известный под названием «свинка», относится к широко распространенным инфекционным заболеваниям, с выраженной сезонностью. Пик заболеваемости приходится на весну. Вирус паротита поражает только человека. Обычно эпидемическим паротитом болеют дети в возрасте от 5 до 9 лет. Основными клиническими симптомами эпидемического паротита являются лихорадка и острое воспаление слюнных желез. Возможны тяжелые осложнения такие, как менингит, энцефалит и эпидидимоорхит. При энцефалите, вызываемом вирусом паротита, смертность составляет 1-2%.

Важно проводить лабораторное подтверждение инфекции серологическим методом во всех случаях подозрения на паротит.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест основан на классическом методе двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа. Антигенный материал, выделенный из клеточной культуры, зараженной вирусом паротита (ВП), адсорбирован на лунках микропланшета. На первой стадии инкубации антитела к ВП, содержащиеся в контролях и исследуемых образцах, связываются с иммобилизованными антигенами (ВП АГ). После промывки, удаляющей не связавшиеся компоненты сывороток, в лунки добавляется конъюгат, представляющий собой антитела к IgG человека, меченые пероксидазой хрена (HRP). В результате инкубации (стадия 2) конъюгат специфически связывается на поверхности лунок с антителами класса IgG, образуя типоспецифические иммунокомплексы. После повторной промывки, удаляющей не связавшийся конъюгат, в лунки вносится субстрат (стадия 3). Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом ТМБ приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет с голубого на желтый после добавления стоп-реагента. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG к ВП в образце. Оптическая плотность контролей и образцов определяется на микропланшетном фотометре с длиной волны 450 нм (например, HUMAREADER или ELISYS). Результат интерпретируется как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением уровня отсечения cut-off, или рассчитывается в специальных единицах фирмы HUMAN (HU/мл) с использованием положительного контроля в качестве калибратора.

МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ И ИХ СОСТАВ

MIC	Стрипы 8-луночные (код MUM G, в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, с иммобилизованным антигеном ВП; полученным методом культуры клеток; в упаковке с влагопоглотителем	12 шт.
NC	ВП IgG отрицательный контроль (зеленая крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
PC	ВП IgG положительный контроль (красная крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
DIL-G 5121	Буфер для разведения IgG образцов (белая крышка) Готовый к использованию 0,01 М фосфатный буфер, <u>зеленого цвета</u> ; содержит 8 г/л хлорида натрия и 10 г/л альбумина; pH 6,5±0,2	1×100 мл
CON	Конъюгат анти-IgG (белая крышка) Готовый к использованию раствор кроличьих антител к IgG человека, меченых пероксидазой хрена, <u>красного цвета</u>	1×12 мл

WS 5102	Промывочный раствор (белая крышка) Концентрат (на 1000 мл готового раствора, содержащего 10 ммоль/л трис-солевого буфера и 8 г/л хлорида натрия; pH 7,2±0,2)	1×50 мл
SUB 5103	Субстратный реагент (черная крышка) Готовый к использованию, бесцветный или голубоватый; содержит 1,2 ммоль/л 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и 3 ммоль/л перекиси водорода; pH 3,7±0,2	1×13 мл
STOP 5104	Стоп-реагент (красная крышка) Готовый к использованию, содержит 0,5M серную кислоту	1×15 мл
	Клейкая пленка для стрипов	2 шт.

- Общее содержание консервантов в реагентах < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования. Избегайте контакта с кожей и слизистыми. Обращайтесь со всеми образцами и контролями как с потенциально инфекционными материалами. Проверка (на уровне доноров) контролей, входящих в состав набора, на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBsAg, дала отрицательный результат. В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) пользуйтесь защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

После исследования все материалы, контактировавшие с образцами пациентов или контролями, должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °C, замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом).

Стоп-реагент **STOP** содержит серную кислоту, способную вызвать ожоги глаз, кожи и слизистых покровов. При контакте с этим реагентом тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, в условиях хранения при температуре 2-8 °C.

После вскрытия флаконов реагенты пригодны к использованию в течение 60 дней.

Стрипы **MIC** (код MUM G)

- Планшет, состоящий из 12 стрипов в рамке-держателе, запаян под вакуумом в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.
- Перед вскрытием упаковку с планшетом следует прогреть до комнатной температуры.
- Неиспользованные стрипы необходимо вернуть обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застежкой и хранить в таком виде при температуре 2-8 °C.

Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием прогрейте все реагенты до **комнатной температуры**. (15-25 °C). Неиспользуемые реагенты следует всегда хранить при температуре 2-8 °C.

Примечание: Реагенты общего назначения **DIL-G 5121**, **WS 5102**, **SUB 5103** и **STOP 5104** взаимозаменяемы между различными партиями (лотами) набора и различными наборами фирмы HUMAN. В ИФА тестах на IgG антитела используйте только IgG буфер для разведения образцов **DIL-G 5121**.

Все остальные реагенты специфичны к конкретной партии (лоту) набора и не могут быть заменены реагентами из другой партии. При работе с данным набором не допускается использование каких-либо реагентов других производителей.

Рабочий раствор промывочного буфера **WASH**

- Для получения рабочего раствора промывочного буфера разведите концентрат **WS 5102** в соотношении 1+20 свежей деионизованной водой (например: 50 мл концентрата **WS 5102** + 1000 мл деионизованной воды = 1050 мл).
- Стабильность: в течение 60 дней при температуре 15-25 °C.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотки

Не используйте сыворотки с сильным гемолизом или липемией.

Нативные сыворотки могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8 °C, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20 °C. Допускается только однократное замораживание.

Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите последние центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не смешивайте реагенты из разных партий наборов. Не путайте крышки от флаконов, чтобы избежать риска контаминации. Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера образцов и контролей в листок-формуляр, приложенный к набору.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов **MIC** или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование контролей должно проводиться в дубликатах. Вносить образцы и контроли необходимо как можно ближе ко дну лунки.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования образцов не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины образцов. Если для анализа используется больше одного планшета, контроли следует выполнять на каждом планшете.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Добавление рабочего раствора субстрата **SUB** инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента **STOP**. Во время развития окраски инкубируйте планшеты в темноте.

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок в 5% раствор гипохлорита натрия и внесите в них рабочий раствор промывочного буфера **WASH**. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку еще 3 раза.

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его рабочим раствором промывочного буфера **WASH** и промойте лунки 4 или 5 раз. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял лунки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости должен быть менее 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть прогреты до комнатной температуры.

Подготовка образцов:

Разведите сыворотки пациентов в соотношении 1+100 IgG буфером для разведения образцов **DIL-G 5121**.

Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 1 мл буфера **DIL-G 5121** и тщательно перемешайте.

Разведенные образцы до проведения анализа могут храниться в течение 48 часов при температуре 2-8 °C.

Контроли готовы к использованию и разведения не требуют.

Стадия 1 Внесите в лунки:	Лунка [объем жидкости в мкл]			
	A1 бланк	B1/C1 Отриц. контроль NC	D1/E1 Полож. контроль PC	F1... Образец
NC в две лунки	--	100	--	--
PC в две лунки	--	--	100	--
Разведенные образцы	--	--	--	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 4 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350

Стадия 2				
Внесите в лунки:				
Конъюгат анти-IgG CON	--	100	100	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 5 раз, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 3 Внесите в лунки:				
Субстратный реагент SUB 5103	100	100	100	100
Инкубируйте 15 минут при 17-25 °C в темноте (см. P8).				
Добавьте стоп-реагент STOP 5104	100	100	100	100
Тщательно перемешайте.				
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.				
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение не более чем 30 минут) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм, используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.				

РАСЧЕТ КОНТРОЛЬНЫХ ВЕЛИЧИН И Cut-off

Расчет контрольных показателей и cut-off

Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля **NC** в лунках B1 и C1 – (**MNC**) и положительного контроля **PC** в лунках D1 и E1 (**MPC**) рассчитывается по формулам:

$$MNC = \frac{ОП_{450}(B1) + ОП_{450}(C1)}{2} \quad MPC = \frac{ОП_{450}(D1) + ОП_{450}(E1)}{2}$$

Уровень отсечения (cut-off) рассчитывается по формуле:

$$COV = MNC + (0,1 \times MPC)$$

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

1. ОП бланка в лунке A1 < 0,150
2. MNC ≤ 0,250
3. MPC ≥ 0,750
4. MPC : MNC ≥ 5

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой ≥ COV + 15%, результат считается **положительным по анти-ВП IgG**.
- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой < COV - 15%, результат считается **отрицательным по анти-ВП IgG**.

В силу физиологической и аналитической изменчивости, значения, лежащие в пределах 15% диапазона по обе стороны cut-off, являются **неопределенными** (серая зона). Образцы, показавшие неопределенный результат, рекомендуется проанализировать повторно, параллельно со свежей сывороткой, взятой через 7-14 дней, ставя каждую из сывороток в дубликатах. Для интерпретации следует использовать изменение уровня специфических антител с учетом также анамнеза и данных других исследований. Образцы, повторно давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать подтверждающим тестом. Клиническое значение результатов, отражающих изменение концентрации специфических IgG антител к ВП, следует интерпретировать с осторожностью.

При отсутствии фотометра возможен визуальный учет результатов, при этом необходимо соблюдение следующих условий:

- Лунка A1 с бланком должна быть бесцветной на глаз.
- Образец считается положительным, если окраска лунки с образцом явно интенсивнее, чем окраска лунок B1/C1 с отрицательным контролем **NC**.

Расчет концентрации IgG антител к ВП в единицах HUMAN

Положительные результаты определения IgG к ВП могут быть рассчитаны в относительных единицах фирмы HUMAN (НУ/мл):

$$\text{НУ/мл} = \frac{\text{ОП}_{\text{образца}}}{\text{МРС}} \times 100$$

где ОП_{образца} - среднее значение оптической плотности ОП₄₅₀ в лунках с образцом;

МРС - среднее значение оптической плотности ОП₄₅₀ в лунках с положительным контролем.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста Паротит IgG фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/el-mumpg.pdf> или

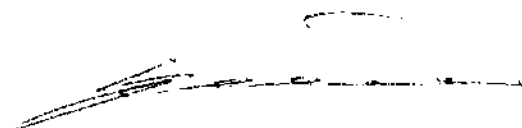
<http://www.human-de.com/data/gb/vr/el-mumpg.pdf>

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

«УТВЕРЖДАЮ»
Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

П.Г. Каленик

« 1 » июня 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения антител IgM к вирусу паротита (Mumps IgM)
производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)

Паротит IgM (MUMPS IgM)

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgM к вирусу паротита в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

IVD

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемический паротит, известный под названием «свинка», относится к широко распространенным инфекционным заболеваниям, с выраженной сезонностью. Пик заболеваемости приходится на весну. Вирус паротита поражает только человека. Обычно эпидемическим паротитом болеют дети в возрасте от 5 до 9 лет. Основными клиническими симптомами эпидемического паротита являются лихорадка и острое воспаление слюнных желез. Возможны такие тяжелые осложнения, как менингит, энцефалит и эпидидимоорхит. При энцефалите, вызываемом вирусом паротита, смертность составляет 1-2%.

Важно проводить лабораторное подтверждение инфекции серологическим методом во всех случаях подозрения на паротит.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител класса IgM к вирусу паротита (анти-ВП IgM) осуществляется классическим методом двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа. Антигенный материал, выделенный из клеточной культуры, зараженной вирусом паротита (ВП), адсорбирован на лунках микропланшета. На первой стадии инкубации антитела к ВП, содержащиеся в контролях и исследуемых образцах, связываются с иммобилизованными антигенами (ВП АГ). После промывки, удаляющей не связавшиеся компоненты сывороток, в лунки добавляется конъюгат, представляющий собой антитела к IgM человека, меченые пероксидазой хрена (HRP). В результате инкубации (стадия 2) конъюгат специфически связывается на поверхности лунок с антителами класса IgM, образуя типоспецифические иммунокомплексы. Для устранения влияния ревматоидного фактора и конкуренции с IgG антителами, буфер для разведения образцов содержит антитела к IgG человека.

После повторной промывки, удаляющей не связавшийся конъюгат, в лунки вносится субстрат (стадия 3). Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом ТМБ приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет с синего на желтый после добавления стоп-реагента. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации анти-ВП IgM антител в образце и может быть измерена на микропланшетном фотометре с длиной волны 450 нм (например, HUMAREADER). Результат интерпретируется как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением уровня отсечения cut-off.

МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ И ИХ СОСТАВ

MIC	Стрипы 8-луночные (код MUM M, в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, с иммобилизованным ВП антигеном, полученным методом культуры клеток, в упаковке с влагопоглотителем	12 шт.
NC	ВП-IgM отрицательный контроль (зеленая крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
PC	ВП-IgM положительный контроль (красная крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1×2,5 мл
DIL-M 5111	IgM буфер для разведения образцов (синяя крышка) Готовый к использованию 0,01 М фосфатный буфер, <u>зеленого цвета</u> ; содержит 8 г/л хлорида натрия, 10 г/л альбумина и антитела козы к IgG человека; pH 6,5±0,2	1×100 мл
CON	Конъюгат анти-IgM (белая крышка)	1×12 мл

Готовый к использованию раствор кроличьих антител к IgM человека, меченых пероксидазой хрена, красного цвета

WS 5102	Промывочный раствор (белая крышка) Концентрат (на 1000 мл готового раствора, содержащего 10 ммоль/л трис-солевого буфера и 8 г/л хлорида натрия; pH 7,2±0,2)	1×50 мл
SUB 5103	Субстратный реагент (черная крышка) Готовый к использованию, бесцветный или светло-голубой, содержит 1,2 ммоль/л 3,3',5,5' тетраметилбензидина (ТМБ) и 3 ммоль/л перекиси водорода	1×13 мл
STOP 5104	Стоп-реагент (красная крышка) Готовый к использованию, содержит 0,5M серную кислоту	1×15 мл
	Клейкая пленка для стрипов	2 шт.

- Общее содержание консервантов в реагентах составляет < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования. Избегайте контакта с кожей и слизистыми. Обращайтесь со всеми образцами и контролями как с потенциально инфекционными материалами. Проверка (на уровне доноров) контролей, входящих в состав набора, на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBsAg, дала отрицательный результат. В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) пользуйтесь защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

После исследования все материалы, контактировавшие с образцами пациентов или контролями, должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом).

Стоп-реагент **STOP** содержит серную кислоту, способную вызвать ожоги глаз, кожи и слизистых покровов. При контакте с этим реагентом тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, в условиях хранения при температуре 2-8 °С.

После вскрытия флаконов реагенты пригодны к использованию в течение 60 дней (см. Примечание).

Стрипы **MIC** (код MUM M)

- Планшет, состоящий из 12 стрипов в рамке-держателе, запаян под вакуумом в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.
- Перед вскрытием упаковку с планшетом следует прогреть до комнатной температуры.
- Неиспользованные стрипы необходимо вернуть обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застежкой и хранить в таком виде при температуре 2-8 °С.

Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием прогрейте все реагенты до **комнатной температуры**. (15-25 °С). Неиспользуемые реагенты следует всегда хранить при температуре 2-8 °С.

Примечание: Реагенты общего назначения **DIL-M 5111**, **WS 5102**, **SUB 5103** и **STOP 5104** взаимозаменяемы между различными партиями (лотами) набора и различными наборами фирмы HUMAN. В ИФА тестах на IgM антитела используйте только IgM буфер для разведения образцов **DIL-M 5111**.

Все остальные реагенты специфичны к конкретной партии (лоту) набора и не могут быть заменены реагентами из другой партии. При работе с данным набором не допускается использование каких-либо реагентов других производителей.

Рабочий раствор промывочного буфера **WASH**

- Для получения рабочего раствора промывочного буфера разведите концентрат **WS 5102** в соотношении 1+20 свежей деионизованной водой (например: 50 мл концентрата **WS 5102** + 1000 мл деионизованной воды = 1050 мл).
- Стабильность: в течение 60 дней при температуре 15-25°С.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотки

Не используйте сыворотки с сильным гемолизом или липемией.

Нативные сыворотки могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8 °C, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20 °C. Допускается только однократное замораживание. Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите последние центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не смешивайте реагенты из разных партий наборов. Не путайте крышки от флаконов, чтобы избежать риска контаминации. Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера образцов и контролей в листок-формуляр, приложенный к набору.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов **MIC** или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование контролей должно проводиться в дубликатах. Вносить образцы и контроли необходимо как можно ближе к дну лунки.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования образцов не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины образцов. Если для анализа используется больше одного планшета, контроли следует выполнять на каждом планшете.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Добавление рабочего раствора субстрата **SUB** инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента **STOP**. Во время развития окраски инкубируйте планшеты в темноте.

P9: Помутнение буфера для разведения образцов **DIL-M** после добавления в него образца не влияет на результаты исследования.

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок в 5% раствор гипохлорита натрия и внесите в них рабочий раствор промывочного буфера **WASH**. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку еще 3 раза.

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его рабочим раствором промывочного буфера **WASH** и промойте лунки 4 или 5 раз. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял лунки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости не должен превышать 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть прогреты до комнатной температуры.

Подготовка образцов:

Разведите сыворотки пациентов в соотношении 1+100 IgM буфером для разведения образцов **DIL-M 5111**. Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 1 мл буфера **DIL-M 5111** и тщательно перемешайте (см. P9).

Прежде, чем продолжать исследование, разведенные образцы необходимо выдержать, как минимум, 5 минут при комнатной температуре.

Разведенные образцы до проведения анализа могут храниться в течение 24 часов при температуре 2-8 °C.

Контроли готовы к использованию и разведения не требуют.

Стадия 1	Лунка [объем жидкости в мкл]			
	A1	B1/C1	D1/E1	F1...
Внесите в лунки:	бланк	Отриц. контроль NC	Полож. контроль PC	Образец

NC в две лунки	--	100	--	--
PC в две лунки	--	--	100	--
Разведенные образцы	--	--	--	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 4 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 2				
Внесите в лунки:				
Конъюгат анти-IgM CON	--	100	100	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 5 раз, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 3				
Внесите в лунки:				
Субстратный реагент SUB 5103	100	100	100	100
Инкубируйте 15 минут при 17-25 °C в темноте (см. P8).				
Добавьте стоп-реагент STOP 5104	100	100	100	100
Тщательно перемешайте.				
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.				
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение не более чем 30 минут) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм, используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.				

РАСЧЕТ КОНТРОЛЬНЫХ ВЕЛИЧИН И Cut-off

Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля NC в лунках B1 и C1 – (MNC) и положительного контроля PC в лунках D1 и E1 (MPC) рассчитывается по формулам:

$$MNC = \frac{ОП_{450}(B1) + ОП_{450}(C1)}{2} \quad MPC = \frac{ОП_{450}(D1) + ОП_{450}(E1)}{2}$$

Значение уровня отсечения, cut-off (COV), рассчитывается по формуле:

$$COV = MNC + (0,2 \times MPC)$$

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

1. ОП бланка в лунке A1 < 0,150
2. MNC ≤ 0,250
3. MPC ≥ 0,400
4. MPC : MNC ≥ 3

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой ≥ COV + 15%, результат считается **положительным по анти-ВП IgM**.
- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой < COV - 15%, результат считается **отрицательным по анти-ВП IgM**.

В силу физиологической и аналитической изменчивости, значения, лежащие в пределах 15% диапазона по обе стороны cut-off, являются **неопределенными** (серая зона). Образцы, показавшие неопределенный

результат, рекомендуется проанализировать повторно, параллельно со свежей сывороткой, взятой через 7-14 дней, ставя каждую из сывороток в дубликатах. При интерпретации результатов IgM теста необходимо также учитывать тенденцию изменения уровня специфических антител, в том числе и антител класса IgG (для этого можно использовать тест HUMAN ELISA IgG), равно как анамнез и данные других исследований. Образцы, повторно давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать подтверждающим тестом.

При отсутствии фотометра возможен визуальный учет результатов, при этом необходимо соблюдение следующих условий:

- Лунка A1 с бланком должна быть бесцветной на глаз.
- Образец считается положительным, если окраска лунки с образцом явно интенсивнее, чем окраска лунок B1/C1 с отрицательным контролем **NC**.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста Паротит IgM фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/el-mumpm.pdf> или
<http://www.human.de/data/gb/vr/el-mumpm.pdf>

Примечание

Компоненты набора стабильны до окончания указанного срока годности даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента зависит от количества отборов реагентов. 60-дневный срок использования реагентов установлен из соображения надежности получения результатов.

При работе с набором следует обеспечить постоянное соблюдение в лаборатории основных требований GLP (надлежащей лабораторной практики).

Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы их собственными крышками немедленно после отбора реагентов; отбирать только необходимое количество реагента, если предполагается его соприкосновение с другими растворами, способными вызвать контаминацию, например образцами пациентов; как можно быстрее возвращать исходные реагенты, если они не используются, в стандартные условия хранения (2-8 °C).

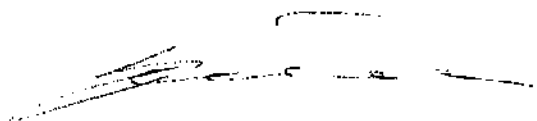
Всегда должно проверяться соблюдение условий достоверности результатов теста.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

«УТВЕРЖДАЮ»
Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

П.Г. Каленик
« 1 » июня 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения антител IgG к вирусу кори (Measles IgG)
производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)

Корь IgG (MEASLES IgG)

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgG к вирусу кори в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений



ВВЕДЕНИЕ

Корь (Measles) - вирусное заболевание, описанное впервые более 2000 лет назад и существующее в настоящее время во всех странах мира. Вирус кори живет только в организме человека. В развивающихся странах корь поражает почти всех детей в возрасте до 5 лет и каждый год уносит жизни 1-2 миллионов человек. Человек является природным резервуаром этой инфекции, и причем единственным организмом-хозяином для вируса кори.

Обычно клинические симптомы кори появляются на 10-14 сутки от заражения и выражаются в проявлениях общей интоксикации и появлении характерной сыпи, распространяющейся с головы на туловище и конечности. У детей в возрасте до года корь протекает обычно в более легкой форме. Описаны также случаи атипичного течения кори с более тяжелыми и длительными клиническими проявлениями, которая может быть спутана с ветряной оспой или с пятнистой лихорадкой Скапистых гор.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест основан на классическом методе двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа. Антигенный материал, выделенный из клеточной культуры, зараженной вирусом кори (ВК), адсорбирован на лунках микропланшета. На первой стадии инкубации антитела к ВК, содержащиеся в контролях и исследуемых образцах, связываются с иммобилизованными антигенами. После промывки, удаляющей не связавшиеся компоненты сывороток, в лунки добавляется конъюгат, представляющий собой антитела к IgG человека, меченые пероксидазой хрена (HRP). В результате инкубации (стадия 2) конъюгат специфически связывается на поверхности лунок с антителами класса IgG, образуя типоспецифические иммунокомплексы. После повторной промывки, удаляющей не связавшийся конъюгат, в лунки вносится субстрат (стадия 3). Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом ТМБ приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна уровню IgG к ВК в образце и может быть определена фотометрированием при 450 нм. Результат интерпретируется как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением уровня отсечения cut-off, либо рассчитывается в Международных единицах (МЕд/мл) или специальных единицах фирмы HUMAN (НУ/мл) с использованием положительного контроля в качестве калибратора.

МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ И ИХ СОСТАВ

МІС	Стрипы 8-луночные (код MLS G, в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, с иммобилизованным антигеном ВК; в упаковке с влагопоглотителем	12 шт.
NC	ВК-IgG отрицательный контроль (зеленая крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки	1x2,5 мл
PC	ВК-IgG положительный контроль (красная крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки; 40 мМЕд/мл (±10%)* Откалиброван по 1-му стандартному препарату ВОЗ антисыворотки к ВК *Предварительно разведенный препарат на основе человеческой сыворотки, готовый к применению, соответствует содержанию анти-ВК в нативной сыворотке 4 МЕд/мл	1x2,5 мл

DIL-G 5121	Буфер для разведения IgG образцов (белая крышка) Готовый к использованию 0,01 М фосфатный буфер, <u>зеленого цвета</u> ; содержит 8 г/л хлорида натрия и 10 г/л альбумина; pH 6,5±0,2	1×100 мл
CON	Конъюгат анти-IgG (белая крышка) Готовый к использованию раствор кроличьих антител к IgG человека, меченых пероксидазой хрена, <u>красного цвета</u>	1×12 мл
WS 5102	Промывочный раствор (белая крышка) Концентрат (на 1000 мл готового раствора, содержащего 10 ммоль/л трис-солевого буфера и 8 г/л хлорида натрия; pH 7,2±0,2)	1×50 мл
SUB 5103	Субстратный реагент (черная крышка) Готовый к использованию, бесцветный или голубоватый; содержит 1,2 ммоль/л 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и 3 ммоль/л перекиси водорода; pH 3,7±0,2	1×13 мл
STOP 5104	Стоп-реагент (красная крышка) Готовый к использованию, содержит 0,5М серную кислоту	1×15 мл
	Клейкая пленка для стрипов	2 шт.

- Общее содержание консервантов в реагентах < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования. Избегайте контакта с кожей и слизистыми. Проверка контролей, входящих в состав набора, на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBsAg, дала отрицательный результат. В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) пользуйтесь защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

После исследования все материалы, контактировавшие с образцами пациентов или контролями, должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом).

Стоп-реагент **STOP** содержит серную кислоту, способную вызвать ожоги глаз, кожи и слизистых покровов. При контакте с этим реагентом тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, в условиях хранения при температуре 2-8 °С.

После вскрытия флаконов реагенты пригодны к использованию в течение 2 месяцев.

Стрипы **MIC** (код MLS G)

- Планшет, состоящий из 12 стрипов в рамке-держателе, запаян под вакуумом в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.
- Перед вскрытием упаковку с планшетом следует прогреть до комнатной температуры.
- Неиспользованные стрипы необходимо вернуть обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застежкой и хранить в таком виде при температуре 2-8 °С.

Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием дайте всем реагентам прогреться до **комнатной температуры**. (15-25 °С). Неиспользуемые реагенты следует всегда хранить при температуре 2-8 °С.

Примечание: Реагенты общего назначения **DIL-G 5121**, **WS 5102**, **SUB 5103** и **STOP 5104** взаимозаменяемы между различными партиями (лотами) набора и различными наборами фирмы HUMAN. В ИФА тестах на IgG антитела используйте только IgG буфер для разведения образцов **DIL-G 5121**.

Все остальные реагенты специфичны к конкретной партии (лоту) набора и не могут быть заменены реагентами из другой партии. При работе с данным набором не допускается использование каких-либо реагентов других производителей.

Рабочий раствор промывочного буфера **WASH**

- Для получения рабочего раствора промывочного буфера разведите концентрат **WS 5102** в соотношении 1+20 свежей дистиллированной водой (например: 50 мл концентрата **WS 5102** + 1000 мл дистиллированной воды = 1050 мл).
- Стабильность: 1 неделя при температуре 2-8 °С.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотки

Не используйте образцы с сильным гемолизом или липемией.

Образцы могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8 °C, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20 °C. Допускается только однократное замораживание. Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите последние центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не смешивайте реагенты из разных партий наборов. Не путайте крышки от флаконов. Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера контролей и образцов в листок-формуляр, приложенный к оригиналу инструкции.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов **MIC** или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование контролей должно проводиться в дубликатах. Вносить образцы и контроли необходимо как можно ближе к дну лунки.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины образцов. Если для анализа используется больше одного планшета, контроли следует ставить с каждым из них.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Добавление рабочего раствора субстрата **SUB** инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента **STOP**. Во время развития окраски инкубируйте планшеты в темноте.

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок в 5% раствор гипохлорита натрия и внесите в них рабочий раствор промывочного буфера **WASH**. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку.

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его рабочим раствором промывочного буфера **WASH** и промойте лунки 4 или 5 раз. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял лунки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости должен быть менее 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры.

Подготовка образцов:

Разведите сыворотки пациентов в соотношении 1+100 IgG буфером для разведения образцов **DIL-G 5121**. Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 1 мл буфера **DIL-G 5121** и тщательно перемешайте.

Разведенные образцы до проведения анализа могут храниться в течение 48 часов при температуре 2-8 °C.

Контроли готовы к использованию и разведения не требуют.

Стадия 1 Внесите в лунки:	Лунка [объем жидкости в мкл]			
	A1 бланк	B1/C1 Отриц. контроль NC	D1/E1 Полож. контроль PC	F1... Образец

NC в две лунки	--	100	--	--
PC в две лунки	--	--	100	--
разведенные образцы	--	--	--	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 4 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 2				
Внесите в лунки:				
Конъюгат анти-IgG CON	--	100	100	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 5 раз, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 3				
Внесите в лунки:				
Субстратный реагент SUB 5103	100	100	100	100
Инкубируйте 15 минут при 17-25 °C (см. P8).				
Добавьте стоп-реагент STOP 5104	100	100	100	100
Тщательно перемешайте.				
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.				
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение не более чем 30 минут) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм, используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.				

РАСЧЕТ КОНТРОЛЬНЫХ ВЕЛИЧИН И Cut-off

Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля NC в лунках B1 и C1 – (MNC) и положительного контроля PC в лунках D1 и E1 (MPC) рассчитывается по формулам:

$$MNC = \frac{ОП_{450}(B1) + ОП_{450}(C1)}{2}; \quad MPC = \frac{ОП_{450}(D1) + ОП_{450}(E1)}{2}$$

Значение уровня отсеечения, cut-off (COV), рассчитывается по формуле:

$$COV = MNC + (0,1 \times MPC)$$

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

1. ОП бланка в лунке A1 < 0,150
2. MNC ≤ 0,250
3. MPC ≥ 0,750
4. MPC : MNC ≥ 5

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой ≥ COV + 15%, результат считается **положительным по анти-ВК IgG**.
- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой < COV - 15%, результат считается **отрицательным по анти-ВК IgG**.

В силу физиологической и аналитической изменчивости, значения, лежащие в пределах 15% диапазона по обе стороны cut-off, являются **неопределенными** (серая зона). Образцы, показавшие неопределенный результат, рекомендуется проанализировать повторно, параллельно со свежей сывороткой, взятой через 7-14 дней, ставя каждую из сывороток в дубликатах. Для интерпретации следует использовать изменение уровня специфических антител с учетом также анамнеза и данных других исследований. Образцы, повторно давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать подтверждающим тестом.

Клиническое значение результатов, отражающих изменение концентрации специфических IgG антител к ВК, следует интерпретировать с осторожностью.

При отсутствии фотометра возможен визуальный учет результатов, при этом необходимо соблюдение следующих условий:

- Лунка А1 с бланком должна быть бесцветной на глаз.
- Образец считается положительным, если окраска лунки с образцом явно интенсивнее, чем окраска лунок В1/С1 с отрицательным контролем **NC**.

Расчет концентрации анти-ВК IgG антител в единицах HUMAN или единицах ВОЗ

Положительные результаты определения IgG к ВК могут быть рассчитаны в относительных единицах фирмы HUMAN (НУ/мл) или в Международных единицах ВОЗ (МЕд/мл):

$$\text{НУ/мл} = \frac{\text{ОП}_{\text{образца}}}{\text{МРС}} \times 100$$

или

$$\text{МЕд/мл (ВОЗ)} = \frac{\text{ОП}_{\text{образца}}}{\text{МРС}} \times 4,0$$

где ОП_{образца} - среднее значение оптической плотности ОП₄₅₀ в лунках с образцом;

МРС - среднее значение оптической плотности ОП₄₅₀ в лунках с положительным контролем.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста Корь IgG фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/el-measg.pdf> или
<http://www.human.de/data/gb/vr/el-measg.pdf>

Примечание

Компоненты набора стабильны до окончания указанного срока годности даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента зависит от количества отборов реагентов. 60-дневный срок использования реагентов установлен из соображения надежности получения результатов.

При работе с набором следует обеспечить постоянное соблюдение в лаборатории основных требований GLP (надлежащей лабораторной практики).

Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы их собственными крышками немедленно после отбора реагентов; отбирать только необходимое количество реагента, если предполагается его соприкосновение с другими растворами, способными вызвать контаминацию, например образцами пациентов; как можно быстрее возвращать исходные реагенты, если они не используются, в стандартные условия хранения (2-8 °C).

Всегда должно проверяться соблюдение условий достоверности результатов теста.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции

К.И. Бланк

«УТВЕРЖДАЮ»
Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

П.А. Каленик
« 1 » июня 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения антител IgM к вирусу кори (Measles IgM)
производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)

Корь IgM (MEASLES IgM)

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgM к вирусу кори в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

IVD

ВВЕДЕНИЕ

Корь – вирусное заболевание, описанное впервые более 2000 лет назад и существующее в настоящее время во всех странах мира. Вирус кори живет только в организме человека. В развивающихся странах корь поражает большую часть детей в возрасте до 5 лет и каждый год уносит жизни 1-2 миллионов человек. Природным резервуаром и единственным организмом-хозяином вируса кори является человек.

Имеются три формы проявления клинических симптомов:

- а) Наиболее обычная форма заболевания характеризуется инкубационным периодом, составляющим 10-14 суток и 5-дневным периодом сыпи, покрывающей все тело от головы до ног.
- б) У детей в возрасте до 1 года корь протекает обычно в более легкой смазанной форме.
- в) Описаны также случаи атипичного течения кори с более тяжелыми и длительными клиническими проявлениями, которая может быть спутана с ветряной оспой или с пятнистой лихорадкой Скалистых гор.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител класса IgM к вирусу кори (анти-ВК IgM) осуществляется классическим методом двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа. Лунки микропланшета, являющиеся твердой фазой, покрыты антигенами вируса кори (ВК АГ), полученными из клеточной культуры, зараженной вирусом кори. На первой стадии инкубации антитела к ВК, содержащиеся в контролях и исследуемых образцах, связываются с иммобилизованными антигенами (ВК АГ). Для устранения влияния ревматоидного фактора и конкуренции с IgG антителами, буфер для разведения образцов содержит антитела к IgG человека.

После промывки, удаляющей несвязавшиеся компоненты сывороток, в лунки добавляется конъюгат, представляющий собой антитела к IgM человека, меченые пероксидазой хрена (HRP). В результате инкубации (стадия 2) конъюгат специфически связывается на поверхности лунок с антителами класса IgM, образуя типоспецифические иммунокомплексы.

После повторной промывки, удаляющей несвязавшийся конъюгат, в лунки вносится субстрат (стадия 3). Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом ТМБ приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет с синего на желтый после добавления стоп-реагента. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации анти-ВК IgM антител в образце и может быть измерена на микропланшетном фотометре с длиной волны 450 нм (например, HUMAREADER). Результат интерпретируется, как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением уровня отсечения (cut-off).

МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ И ИХ СОСТАВ

MIQ	Стрипы 8-луночные (код MLS M, в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, с иммобилизованным ВК антигеном, полученным методом культуры клеток; в упаковке с влагопоглотителем	12 шт.
NC	Корь IgM отрицательный контроль (зеленая крышка)	1×2,5 мл

Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки		
PC	Корь IgM положительный контроль (красная крышка)	1×2,5 мл
Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки		
DIL-M	IgM буфер для разведения образцов (синяя крышка)	1×100 мл
5111	Готовый к использованию 0,01 М фосфатный буфер, <u>зеленого цвета</u> ; содержит 8 г/л хлорида натрия, 10 г/л альбумина и козы антитела к IgG человека; pH 6,5±0,2	
CON	Конъюгат анти-IgM (белая крышка)	1×12 мл
Готовый к использованию раствор кроличьих антител к IgM человека, меченых пероксидазой хрена, <u>красного цвета</u>		
WS	Промывочный раствор (белая крышка)	1×50 мл
5102	Концентрат (на 1000 мл готового раствора, содержащего 10 ммоль/л трис-солевого буфера и 8 г/л хлорида натрия; pH 7,2±0,2)	
SUB	Субстратный реагент (черная крышка)	1×13 мл
5103	Готовый к использованию, бесцветный или светло-голубой, содержит 1,2 ммоль/л 3,3',5,5' тетраметилбензидина (ТМБ) и 3 ммоль/л перекиси водорода; pH 3,7±0,2	
STOP	Стоп-реагент (красная крышка)	1×15 мл
5104	Готовый к использованию, содержит 0,5М серную кислоту	
Клейкая пленка для стрипов		2 шт.

- Общее содержание консервантов в реагентах составляет < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования. Избегайте контакта с кожей и слизистыми. Обращайтесь со всеми образцами и контролями как с потенциально инфекционными материалами. Проверка (на уровне доноров) контролей, входящих в состав набора, на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBsAg, дала отрицательный результат. В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) пользуйтесь защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

После исследования все материалы, контактировавшие с образцами пациентов или контролями, должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом).

Стоп-реагент **STOP** содержит серную кислоту, способную вызвать ожоги глаз, кожи и слизистых покровов. При контакте с этим реагентом тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, в условиях хранения при температуре 2-8 °С.

После вскрытия флаконов реагенты пригодны к использованию в течение 60 дней.

Стрипы **MIC** (код MLS M)

- Планшет, состоящий из 12 стрипов в рамке-держателе, запаян под вакуумом в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.
- Перед вскрытием упаковку с планшетом следует прогреть до комнатной температуры.
- Неиспользованные стрипы необходимо вернуть обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застежкой и хранить в таком виде при температуре 2-8 °С.

Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием дайте всем реагентам прогреться до **комнатной температуры**. (15-25 °С). Неиспользуемые реагенты следует всегда хранить при температуре 2-8 °С.

Примечание: Реагенты общего назначения **DIL-M 5111**, **WS 5102**, **SUB 5103** и **STOP 5104** взаимозаменяемы между различными партиями (лотами) набора и различными наборами фирмы HUMAN. В ИФА тестах на IgM антитела используйте только IgM буфер для разведения образцов **DIL-M 5111**.

Все остальные реагенты специфичны к конкретной партии (лоту) набора и не могут быть заменены реагентами из другой партии. При работе с данным набором не допускается использование каких-либо реагентов других производителей.

Рабочий раствор промывочного буфера WASH

- Для получения рабочего раствора промывочного буфера разведите концентрат **WS 5102** в соотношении 1+20 свежей деионизованной водой (например: 50 мл концентрата **WS 5102** + 1000 мл деионизованной воды = 1050 мл).
- Стабильность: в течение 60 дней при температуре 15-25 °C.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**Сыворотки**

Не используйте сыворотки с сильным гемолизом или липемией.

Нативные сыворотки могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8 °C, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20 °C. Допускается только однократное замораживание. Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите последние центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не смешивайте реагенты из разных партий наборов. Не путайте крышки от флаконов, чтобы избежать риска контаминации. Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера образцов и контролей в листок-формуляр, приложенный к набору.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов **MIC** или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование контролей должно проводиться в дубликатах. Вносить образцы и контроли необходимо как можно ближе к дну лунки.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования образцов не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины образцов. Если для анализа используется больше одного планшета, контроли следует выполнять на каждом планшете.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Добавление рабочего раствора субстрата **SUB** инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента **STOP**. Во время развития окраски инкубируйте планшет в темноте.

P9: Помутнение буфера для разведения образцов **DIL-M** после добавления в него образца не влияет на результаты исследования.

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок в 5% раствор гипохлорита натрия и внесите в них рабочий раствор промывочного буфера **WASH**. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку трижды.

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его рабочим раствором промывочного буфера **WASH** и промойте лунки 4 или 5 раз. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял лунки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости должен быть менее 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры.

Подготовка образцов:
 Разведите сыворотки пациентов в соотношении 1+100 IgM буфером для разведения образцов **DIL-M 5111**. Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 1 мл буфера **DIL-M 5111** и тщательно перемешайте (см. P9).
 Прежде, чем продолжать исследование, **разведенные образцы необходимо выдержать, как минимум, 5 минут при комнатной температуре.**
 Разведенные образцы до проведения анализа могут храниться в течение 24 часов при температуре 2-8 °C.
Контроли готовы к использованию и **разведения не требуют.**

Стадия 1 Внесите в лунки:	Лунка [объем жидкости в мкл]			
	A1 бланк	B1/C1 Отриц. контроль NC	D1/E1 Полож. контроль PC	F1... Образец
NC в две лунки	--	100	--	--
PC в две лунки	--	--	100	--
Разведенные образцы	--	--	--	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 4 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 2 Внесите в лунки:				
Конъюгат анти-IgM CON	--	100	100	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 5 раз, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	350	350	350	350
Стадия 3 Внесите в лунки:				
Субстратный реагент SUB 5103	100	100	100	100
Инкубируйте 15 минут при 17-25 °C (см. P8).				
Добавьте стоп-реагент STOP 5104	100	100	100	100
Тщательно перемешайте.				
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.				
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение <u>не более чем 30 минут</u>) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм , используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.				

Расчет контрольных показателей и cut-off

Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля **NC** в лунках B1 и C1 – (**MNC**) и положительного контроля **PC** в лунках D1 и E1 (**MPC**) рассчитывается по формулам:

$$MNC = \frac{ОП_{450}(B1) + ОП_{450}(C1)}{2}$$

$$MPC = \frac{ОП_{450}(D1) + ОП_{450}(E1)}{2}$$

Уровень отсечения (cut-off) рассчитывается по формуле:

$$Cut-off = MNC + (0,2 \times MPC)$$

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

Бланк < 0,150
MNC ≤ 0,250
MPC ≥ 0,400
MPC : MNC ≥ 3

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой ≥ COV + 15%, результат считается **положительным по анти-ВК IgM**.
- Если ОП₄₅₀ в лунке с исследуемой сывороткой < COV - 15%, результат считается **отрицательным по анти-ВК IgM**.

В силу физиологической и аналитической изменчивости, значения, лежащие в пределах 15% диапазона по обе стороны cut-off, являются **неопределенными** (серая зона). Образцы, показавшие неопределенный результат, рекомендуется проанализировать повторно, параллельно со свежей сывороткой, взятой через 7-14 дней, ставя каждую из сывороток в дубликатах. При интерпретации результатов IgM теста необходимо также учитывать тенденцию изменения уровня специфических антител, в том числе и антител класса IgG (для этого можно использовать соответствующий ИФА тест фирмы HUMAN), с учетом также анамнеза и данных других исследований. Образцы, повторно давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать подтверждающим тестом.

При отсутствии фотометра возможен визуальный учет результатов, при этом необходимо соблюдение следующих условий:

- Лунка А1 с бланком должна быть бесцветной на глаз.
- Образец считается положительным, если окраска лунки с образцом явно интенсивнее, чем окраска лунок В1/С1 с отрицательным контролем **NC**.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста Корь IgM фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/el-measm.pdf> или
<http://www.human.de/data/gb/vr/el-measm.pdf>

Примечание

Компоненты набора стабильны до окончания указанного срока годности даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента зависит от количества отборов реагентов. 60-дневный срок использования реагентов установлен из соображения надежности получения результатов.

При работе с набором следует обеспечить постоянное соблюдение в лаборатории основных требований GLP (надлежащей лабораторной практики).

Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы их собственными крышками немедленно после отбора реагентов; отбирать только необходимое количество реагента, если предполагается его соприкосновение с другими растворами, способными вызвать контаминацию, например образцами пациентов; как можно быстрее возвращать исходные реагенты, если они не используются, в стандартные условия хранения (2-8 °C).

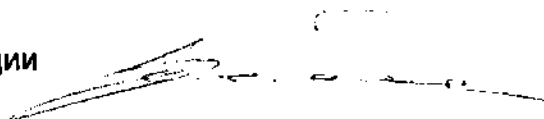
Всегда должно проверяться соблюдение условий достоверности результатов теста.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

«УТВЕРЖДАЮ»
Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

П.Г. Каленик
« 1 » июня 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения антител IgA к Хеликобактер пилори (H. pylori IgA) производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)

H. pylori IgA

Иммуноферментный тест для полуколичественного и количественного определения антител класса IgA к *Helicobacter pylori* в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

IVD

ВВЕДЕНИЕ

Helicobacter pylori (H. pylori, HPYL) представляет собой спиралевидную грам-отрицательную бактерию, заселяющую слизистую желудка человека и способную вызывать различные заболевания желудочно-кишечного тракта. Более 90% пациентов, страдающих хроническим гастритом (тип В), язвой желудка и карциномой желудка, инфицированы *Helicobacter pylori*. Ранняя диагностика и лечение способствуют удалению этих бактерий из организма.

В случае хронической инфекции в качестве первичной диагностики предпочтение следует отдавать определению антител классов IgG и IgA к H. pylori.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител класса IgA к H. pylori (анти-HPYL IgA) осуществляется методом двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа (сэндвич-метод). Антигенный материал (HPYL АГ), выделенный из клеточной культуры, адсорбирован на лунках микропланшета. На первой стадии инкубации специфические анти-HPYL IgA антитела, содержащиеся в контролях и исследуемых образцах, связываются с иммобилизованными HPYL АГ. После промывки, удаляющей несвязавшиеся компоненты сывороток, в лунки добавляется конъюгат, представляющий собой антитела к IgA человека, меченые пероксидазой хрена. В результате инкубации (стадия 2) конъюгат специфически связывается на поверхности лунок с антителами класса IgA, образуя типоспецифические иммунокомплексы. После повторной промывки, удаляющей несвязавшийся конъюгат, в лунки вносится субстрат (стадия 3). Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом ТМБ приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет с синего на желтый после добавления стоп-реагента. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации в образце IgA антител к HPYL и может быть измерена на микропланшетных фотометрах с длиной волны 450 нм (например, приборах линии HUMAREADER или ELISYS производства фирмы HUMAN).

Результат интерпретируется как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением уровня отсеечения (cut-off), либо выражается в Ед/мл.

МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ И ИХ СОСТАВ

MIC	Стрипы 8-луночные (в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, с иммобилизованным антигеном H. pylori (выделенным из культуры клеток); в упаковке с влагопоглотителем	12 шт.
NC	H.pylori - IgA отрицательный контроль (зеленая крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки, 1 Ед/мл	1×2 мл
CC	H.pylori – IgA cut-off контроль (желтая крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки, 10 Ед/мл	1×2 мл
PCL	H.pylori – IgA низкий положительный контроль (синяя крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки; 30 Ед/мл	1×2 мл
PCH	H.pylori – IgA высокий положительный контроль (красная крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки; 200 Ед/мл	1×2 мл
DIL	Буфер для разведения образцов	2×60 мл

Готовый к использованию фосфатно-солевой буфер, синего цвета, содержит БСА и Твин 20; pH 7,0 – 7,5

CON	Конъюгат анти-IgA Готовый к использованию раствор кроличьих антител к IgA человека, меченых пероксидазой хрена, <u>красного цвета</u>	1×13 мл
WS	Промывочный раствор Концентрат; фосфатно-солевой буфер, содержит Твин 20; pH 6,5 – 7,0	2×60 мл
SUB	Субстратный реагент (коричневая баночка) 3,3',5,5' тетраметилбензидин (ТМБ)	1×13 мл
STOP	Стоп-реагент Готовый к использованию, содержит 0,5М серную кислоту	1×13 мл
	Клейкая пленка для стрипов	2 шт.

- Общее содержание консервантов в реагентах составляет < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищу во время исследования. Избегайте контакта с кожей и слизистыми. Проверка контролей, входящих в состав набора, на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBsAg, дала отрицательный результат. В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) пользуйтесь защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

После исследования все материалы, контактировавшие с образцами пациентов или контролями, должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом).

Стоп-реагент **STOP** и субстратный реагент **SUB** могут оказывать раздражающее воздействие на глаза, кожу и слизистые покровы. При контакте с этими реагентами тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках при хранении 2-8 °С.

Стрипы **MIC**

- Планшет запаян в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.
- Перед вскрытием упаковку с планшетом следует прогреть до комнатной температуры.
- Неиспользованные стрипы необходимо вернуть обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застежкой и хранить в таком виде при температуре 2-8 °С.

Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием дайте всем реагентам прогреться до **комнатной температуры**. (15-25 °С). Неиспользуемые реагенты следует всегда хранить при температуре 2-8 °С.

Рабочий раствор промывочного буфера **WASH**

- Для получения рабочего раствора промывочного буфера разведите концентрат **WS** в соотношении 1+9 свежей дистиллированной водой (например: 30 мл концентрата **WS** + 270 мл дистиллированной воды = 300 мл).
- Стабильность: **4 недели при температуре 2-8 °С**.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотки

Не используйте образцы с сильным гемолизом или липемией.

Образцы могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8 °С, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20 °С. Допускается **только однократное замораживание**. Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите последние центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Точно выполняйте приведенную ниже процедуру исследования.

Предварительные замечания

P1: Не смешивайте реагенты из разных партий наборов (из-за риска контаминации). Не путайте крышки от флаконов. Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера контролей и образцов в листок-формуляр, приложенный к оригиналу инструкции.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов **MIC** или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование контролей и образцов должно проводиться в **дубликатах**. Вносить образцы и контроли необходимо **как можно ближе к дну лунки**.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в **одном и том же порядке**, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины образцов. Если для анализа используется больше одного планшета, контроли следует ставить с каждым из них.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Добавление раствора субстрата **SUB** инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента **STOP**. Во время развития окраски инкубируйте планшеты в темноте.

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок в 5% раствор гипохлорита натрия и внесите в них рабочий раствор промывочного буфера **WASH**. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку еще два раза.

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его рабочим раствором промывочного буфера **WASH** и промойте лунки 3 раза. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял лунки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости должен быть менее 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры.

Подготовка образцов:

Разведите сыворотки пациентов в соотношении 1+100 буфером для разведения образцов **DIL**. Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 1 мл буфера **DIL** и тщательно перемешайте.

Контроли готовы к использованию и **разведения не требуют**.

Стадия 1	Лунка [объем жидкости в мкл]			
	A1 Бланк	B1/C1 Отриц. контроль	D1...A2 Полож. контроль	B2... Образец
Внесите в лунки:		NC	PC	
NC в дубликатах	--	100	--	--
CC в дубликатах	--	--	100	--
PC1 в дубликатах	--	--	100	--
PC1 в дубликатах	--	--	100	--
Разведенные образцы	--	--	--	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 60 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 3 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	300	300	300	300
Стадия 2				
Внесите в лунки:				
Конъюгат анти-IgA CON	--	100	100	100
Закройте стрипы MIC клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				

Промойте лунки 3 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера [WASH]	300	300	300	300
Стадия 3				
Внесите в лунки:				
Субстратный реагент [SUB]	100	100	100	100
Инкубируйте 20 минут при 17-25 °C в темноте (см. P8).				
Добавьте стоп-реагент [STOP]	100	100	100	100
Тщательно перемешайте.				
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.				
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение не более чем 30 минут) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм, используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.				

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Средние значения измеренной оптической плотности (ОП) рассчитывают после вычитания ОП бланка (лунка A1).

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

- | | | |
|----|-----|--------------|
| 1. | NC | $\leq 0,150$ |
| 2. | CC | $\geq 0,200$ |
| 3. | PCL | $\geq 0,450$ |
| 4. | PCH | $\geq 0,750$ |

Образцы следует считать **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ**, если измеренные для них величины ОП превышают cut-off более чем на 20%.

Образцы следует считать попадающими в **СЕРУЮ ЗОНУ**, то есть не относящимися четко к положительным или отрицательным, если измеренные для них величины ОП выше или ниже cut-off на 20% и менее.

Образцы следует считать **ОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ**, если измеренные для них величины ОП ниже cut-off более чем на 20%.

$ОП_{450}(\text{пациента}) \geq \text{cut-off} + 20\%$, результат считается положительным по анти-HPYL IgA

$ОП_{450}(\text{пациента}) < \text{cut-off} - 20\%$, результат считается отрицательным по анти-HPYL IgA

Расчет концентрации анти-HPYL IgA антител в Единицах концентрации антител

Результаты, полученные для сывороток пациентов, могут быть выражены в единицах концентрации антител в мл (Ед/мл):

Для этого строят график зависимости ОП контролей от их концентрации (которая указана на этикетках соответствующих флаконов) и по полученной калибровочной кривой, откладывая на ней ОП образцов, определяют концентрацию анти-HPYL IgG антител.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/el-hpyla.pdf> или
<http://www.human.de.com/data/gb/vr/el-hpyla.pdf>

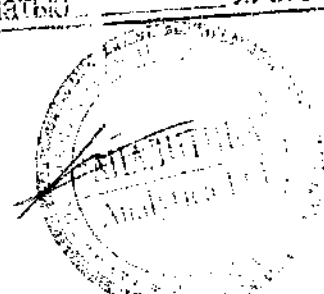
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции

Всего пронумеровано,
 прошнуровано и скреплено
 печатью 2 листов.



«УТВЕРЖДАЮ»

Исполнительный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»П.Г. Каленик
«1» июня 2009 г.**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ****Набор реагентов для определения антител IgG к Хеликобактер пилори (*H. pylori* IgG)
производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)*****H. pylori* IgG**Иммуноферментный тест для количественного определения антител класса IgG к *Helicobacter pylori* в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

IVD

ВВЕДЕНИЕ*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) представляет собой спиралевидную грам-отрицательную бактерию, заселяющую слизистую желудка человека и способную вызывать различные заболевания желудочно-кишечного тракта.Более 90% пациентов, страдающих хроническим гастритом (тип В), язвой желудка и карциномой желудка, инфицированы *H. pylori*. Ранняя диагностика и лечение способствуют удалению этих бактерий из организма. В случае хронической инфекции в качестве первичной диагностики предпочтение следует отдавать определению антител классов IgG и IgA к *H. pylori*.**ПРИНЦИП МЕТОДА**

Определение антител класса IgG к *H. pylori* (анти-HPYL IgG) осуществляется методом двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа (сэндвич-метод). Антигенный материал (HPYL АГ), выделенный из клеточной культуры, адсорбирован на лунках микропланшета. На первой стадии инкубации специфические анти-HPYL IgG антитела, содержащиеся в контролях и исследуемых образцах, связываются с иммобилизованными HPYL АГ. После промывки, удаляющей несвязавшиеся компоненты сывороток, в лунки вносят конъюгат, представляющий собой антитела к IgG человека, меченые пероксидазой хрена. В результате инкубации (стадия 2) конъюгат специфически связывается на поверхности лунок с антителами класса IgG, образуя типоспецифические иммунные комплексы. После повторной промывки, удаляющей несвязавшийся конъюгат, в лунки вносят субстрат (стадия 3). Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом ТМБ приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет с синего на желтый после добавления стоп-реагента. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации в образце IgG антител к HPYL и может быть измерена на микропланшетных фотометрах с длиной волны 450 нм (например, приборах линии HUMAREADER или ELISYS производства фирмы HUMAN).

Результат интерпретируется как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением уровня отсечения (cut-off), либо выражается в Ед/мл.

МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ И ИХ СОСТАВ

MIC	Стрипы 8-луночные (в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, с иммобилизованным антигеном <i>H. pylori</i> (выделенным из культуры клеток); в упаковке с влагопоглотителем	12 шт.
NC	<i>H. pylori</i> - IgG отрицательный контроль (зеленая крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки, 1 Ед/мл	1×2 мл
CC	<i>H. pylori</i> - IgG cut-off контроль (желтая крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки, 10 Ед/мл	1×2 мл
PCL	<i>H. pylori</i> - IgG низкий положительный контроль (синяя крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки, 25 Ед/мл	1×2 мл
PCH	<i>H. pylori</i> - IgG высокий положительный контроль (красная крышка) Готовый к использованию, на основе человеческой сыворотки, 150 Ед/мл	1×2 мл
DIL	Буфер для разведения образцов Готовый к использованию фосфатно-солевой буфер, синего цвета; содержит БСА и	2×60 мл

	Твин 20; pH 7,0 – 7,5	
CON	Конъюгат анти-IgG	1×13 мл
	Готовый к использованию раствор кроличьих антител к IgG человека, меченых пероксидазой хрена, <u>красного цвета</u>	
WS	Промывочный раствор	2×60 мл
	Концентрат; фосфатно-солевой буфер, содержит Твин 20; pH 6,5 – 7,0	
SUB	Субстратный реагент (коричневая баночка)	1×13 мл
	3,3',5,5' тетраметилбензидин (ТМБ)	
STOP	Стоп-реагент	1×13 мл
	Готовый к использованию, содержит 0,5М серную кислоту	
	Клейкая пленка для стрипов	2 шт.

- Общее содержание консервантов в реагентах составляет < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищу во время исследования. Избегайте контакта с кожей и слизистыми. Проверка контролей, входящих в состав набора, на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBsAg, дала отрицательный результат. В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) пользуйтесь защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

После исследования все материалы, контактировавшие с образцами пациентов или контролями, должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом).

Стоп-реагент **STOP** и субстратный реагент **SUB** могут оказывать раздражающее воздействие на глаза, кожу и слизистые оболочки. При контакте с этими реагентами тщательно промойте пораженное место большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, в условиях хранения при температуре 2-8 °С.

Стрипы **MIC**

- Планшет запаян в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.
- Перед вскрытием упаковку с планшетом следует прогреть до комнатной температуры.
- Неиспользованные стрипы необходимо вернуть обратно в пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть его герметизирующей застежкой и хранить в таком виде при температуре 2-8 °С.

Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием дайте всем реагентам прогреться до комнатной температуры. (15-25 °С). Неиспользуемые реагенты следует всегда хранить при температуре 2-8 °С.

Рабочий раствор промывочного буфера **WASH**

- Для получения рабочего раствора промывочного буфера разведите концентрат **WS** в соотношении 1+9 свежей дистиллированной водой (например: 30 мл концентрата **WS** + 270 мл дистиллированной воды = 300 мл).
- Стабильность: **4 недели при температуре 2-8 °С.**

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотки

Не используйте образцы с сильным гемолизом или липемией.

Образцы могут храниться в течение 7 дней при температуре 2-8 °С, более длительное хранение возможно в замороженном виде при температуре -20 °С. Допускается только однократное замораживание. Оттаявшие образцы необходимо гомогенизировать. При наличии в сыворотках взвешенных частиц удалите последние центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Точно выполняйте приведенную ниже процедуру исследования.

Предварительные замечания

P1: Не смешивайте реагенты из разных партий наборов (из-за риска контаминации). Не путайте крышки от флаконов. Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера контролей и образцов в листок-формуляр, приложенный к оригиналу инструкции.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов [MIC] или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование контролей и образцов должно проводиться в дубликатах. Вносить образцы и контроли необходимо как можно ближе ко дну лунки.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования не должно превышать 5 минут. В противном случае, контроли следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины образцов. Если для анализа используется больше одного планшета, контроли следует ставить с каждым из них.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Добавление раствора субстрата [SUB] инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента [STOP]. Во время развития окраски инкубируйте планшет в темноте.

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок в 5% раствор гипохлорита натрия и внесите в них рабочий раствор промывочного буфера [WASH]. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку еще два раза.

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его рабочим раствором промывочного буфера [WASH] и промойте лунки 3 раза. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял лунки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости должен быть менее 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры.

Подготовка образцов:

Разведите сыворотки пациентов в соотношении 1+100 буфером для разведения образцов [DIL].

Например, 10 мкл сыворотки добавьте к 1 мл буфера [DIL] и тщательно перемешайте.

Контроли готовы к использованию и разведения не требуют.

Стадия 1	Лунка [объем жидкости в мкл]			
	A1	B1/C1	D1...A2	B2...
Внесите в лунки:	Бланк	Отриц. контроль	Полож. контроль	Образец
		[NC]	[PC]	
[NC] в дубликатах	--	100	--	--
[CC] в дубликатах	--	--	100	--
[PC] в дубликатах	--	--	100	--
[PCN] в дубликатах	--	--	100	--
Разведенные образцы	--	--	--	100
Закройте стрипы [MIC] клейкой пленкой				
Инкубируйте 60 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 3 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного буфера [WASH]	300	300	300	300
Стадия 2				
Внесите в лунки:				
Конъюгат анти-IgG [CON]	--	100	100	100
Закройте стрипы [MIC] клейкой пленкой				
Инкубируйте 30 минут при 17-25 °C.				
Промойте лунки 3 раза, как описано (см. W1 – W3).				
Рабочий раствор промывочного	300	300	300	300

буфера WASH				
Стадия 3				
Внесите в лунки:				
Субстратный реагент SUB	100	100	100	100
Инкубируйте 20 минут при 17-25 °C в темноте (см. P8).				
Добавьте стоп-реагент STOP	100	100	100	100
Тщательно перемешайте.				
Обнулите планшетный фотометр (например, HUMAREADER) по лунке A1 с бланком.				
После внесения стоп-реагента как можно быстрее (в течение не более чем 30 минут) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм, используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.				

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Средние значения измеренной оптической плотности (ОП) рассчитывают после вычитания ОП бланка (лунка A1).

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

- | | | |
|----|-----|--------------|
| 1. | NC | $\leq 0,150$ |
| 2. | CC | $\geq 0,200$ |
| 3. | PCL | $\geq 0,450$ |
| 4. | PCH | $\geq 0,750$ |

Образцы следует считать **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ**, если измеренные для них величины ОП превышают cut-off более чем на 20%.

Образцы следует считать попадающими в **СЕРУЮ ЗОНУ**, то есть не относящимися четко к положительным или отрицательным, если измеренные для них величины ОП выше или ниже cut-off на 20% и менее.

Образцы следует считать **ОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ**, если измеренные для них величины ОП ниже cut-off более чем на 20%.

$ОП_{450} \text{ (пациента)} \geq \text{cut-off} + 20\%$, результат считается положительным по анти-HPYL IgG

$ОП_{450} \text{ (пациента)} < \text{cut-off} - 20\%$, результат считается отрицательным по анти-HPYL IgG

Расчет концентрации анти-HPYL IgG антител в Единицах концентрации антител

Результаты, полученные для сывороток пациентов, могут быть выражены в единицах концентрации антител в мл (Ед/мл):

Для этого строят график зависимости ОП контролей от их концентрации (которая указана на этикетках соответствующих флаконов) и по полученной калибровочной кривой, откладывая на ней ОП образцов, определяют концентрацию анти-HPYL IgG антител.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сведения об аналитических характеристиках можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/el-hpylg.pdf> или
<http://www.human.de.com/data/gb/vr/el-hpylg.pdf>

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции

Всего пронумеровано,
 прошнуровано и скреплено
 печатью 2 листов.
 К.И. Бланк

