

ВЕКТОР



Набор реагентов для иммуноферментного
выявления иммуноглобулинов класса М
к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ВектоВПГ – IgM

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-2154



1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВектоВПГ – IgM» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Специфическим реагентом набора является очищенный антиген ВПГ, сорбированный на поверхности лунок полистиролового разборного планшета.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках стрипов с иммобилизованным антигеном ВПГ. Иммуноглобулины класса М к ВПГ связываются с иммобилизованным антигеном. Несвязавшийся материал удаляют отмывкой. Связавшиеся IgM выявляют при инкубации с конъюгатом антител к IgM человека с пероксидазой хрена. После второй отмывки количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использова-

нием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце IgM к ВПГ.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

- иммуносорбент – планшет разборный (12 восьми-луночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном ВПГ, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+ ; прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^- ; слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 3,0 мл;
- конъюгат, концентрат (моноклональные антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена; прозрачная жидкость синего цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25; прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при нагревании до 30-40°C) – 2 фл. по 28 мл;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС; прозрачная жидкость малинового цвета) – 1 фл., 10 мл;

- раствор для разведения сывороток (РРС; непрозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 12 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РРК; слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 13 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР; прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ; прозрачная бесцветная или бледно-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 1,0 мл;
- стоп-реагент (прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 12 мл.
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток – 16 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления иммуноглобулинов класса М к ВПГ по стандартной панели предприятия – 100%.

3.2. Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса М к ВПГ по стандартной панели предприятия – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000, приказ Минздравсоцразвития России №735 от 30 октября 2006 г.).

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

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарноэпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

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

4.5. При использовании автоматического промывателя планшета необходимо следить за

состоянием емкости с промывочным раствором и соединительных шлангов, не допуская образования в них микробных заростов. Для этого раз в неделю емкость для промывочного раствора и шланги необходимо промывать 70% этиловым спиртом.

4.6. Пипетки и рабочие поверхности следует обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Нельзя использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

4.8. Точность и воспроизводимость результатов анализа зависят от строгого выполнения следующих правил:

– не используйте реагенты с истекшим сроком годности;

– при постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кро-

ме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, РПРС, СБР, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест»;

– *запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей;*

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

– используйте стеклянную посуду, тщательно вымытую и ополоснутую дистиллированной водой, или (предпочтительно) одноразовую посуду;

– не допускайте высыхания стрипов в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов;

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором субстрата;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

– необходимо следить за состоянием промывочного устройства – регулярно обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом;

– рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спир-

том (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

– никогда не используйте одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и рабочего раствора ТМБ; **обращаем Ваше особое внимание** на то, что малейшее, даже не видимое глазом загрязнение пипеток раствором конъюгата может привести к контаминации всего содержимого флаконов с СБР и ТМБ, поэтому необходимо протирать рабочую поверхность стола и конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом перед внесением ТМБ в СБР;

– проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы;

– не изменяйте протокол исследования;

– если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–650 нм; или при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл;
- промыватель автоматический для планшет;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

6.4. Для отбора исследуемых образцов и компонентов набора реагентов использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%. Следует обратить внимание на точное дозирование и тщательное перемешивание сывороток с раствором, используемым для их разведения. От соблюдения этих требований зависит точность и воспроизводимость результатов анализа.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

7.1. Перед проведением анализа исследуемые образцы и все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, следует выдержать при температуре от 18 до 25°C не менее 60 мин.

7.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

7.2.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

7.2.2. После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение 3 месяцев, но в пределах срока годности набора.

7.3. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Непосредственно перед использованием вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов; остальные стрипы снять с рамки и немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C в течение 3 месяцев, но в пределах срока годности набора.

7.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА ДЛЯ ОТМЫВКИ ПЛАНШЕТА

Раствор для отмывки планшета приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

Хранение: не более 5 суток при 2–8°C.

7.5. ПОДГОТОВКА КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

Положительный и отрицательный контрольные образцы (K^+ , K^-) готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

7.6. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток. Для этого во вспомогательный ряд пробирок или в лунки вспомогательного планшета внести по 90 мкл раствора и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы), тщательно перемешать. При этом малиновый цвет должен измениться на желтый. Если

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тет-раметилбензида		Раствор для отмывки планшетов	
	Конъюгат, мЛ	РРК, мЛ	ТМБ, концентрат, мЛ	СБР, мЛ	ФСБ-Т, концентрат мЛ	Дистилл. вода, мЛ
1	0,1	1,0	0,05	1,0	2,0	до 50
2	0,2	2,0	0,10	2,0	4,0	до 100
3	0,3	3,0	0,15	3,0	6,0	до 150
4	0,4	4,0	0,20	4,0	8,0	до 200
5	0,5	5,0	0,25	5,0	10,0	до 250
6	0,6	6,0	0,30	6,0	12,0	до 300
7	0,7	7,0	0,35	7,0	14,0	до 350
8	0,8	8,0	0,40	8,0	16,0	до 400
9	0,9	9,0	0,45	9,0	18,0	до 450
10	1,0	10,0	0,50	10,0	20,0	до 500
11	1,1	11,0	0,55	11,0	22,0	до 550
12	1,2	12,0	0,60	12,0	24,0	до 600

изменения цвета не произошло, данный образец может дать неправильный результат.

Хранение: при температуре 18–25°C не более 3 ч.

7.7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЬЮГАТА

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагентов внести необходимое количество РРК, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре 18–25°C не более 3 часов.

7.8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА

Внимание! Рекомендуется выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином. Посуду и наконечники для пипетки, контактирующие с раствором ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагентов внести необходимое количество СБР, добавить соответствующее количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

Допустимо голубое окрашивание рабочего раствора ТМБ, которое не оказывает влияния на результаты анализа.

Хранение: не более 3 часов при 18–25°C в темноте.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Раствор для разведения сывороток перед использованием перемешать встряхиванием.

8.1. Внесение контрольных образцов и исследуемых сывороток.

В лунку А-1 внести 100 мкл раствора для разведения сывороток (контроль поглощения рабочего раствора ТМБ).

Контрольные образцы внести по следующей схеме:

- **1 лунка** – 100 мкл K^+ ;
- **2 лунки** – по 100 мкл K^- .

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови (п. 7.6.), тщательно перемешать.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37°C.

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть планшет 5 раз раствором для отмывки планшета (п. 7.4.) с помощью промывочного устройства. При этом в каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. В лунку А-1 внести 100 мкл РРК (контроль поглощения рабочего раствора ТМБ). В остальные лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.7.).

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37°C.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.4. По окончании инкубации промыть планшет как описано в п. 8.2.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидаина (п. 7.8.).

Планшет выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре 18–25°C.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидаина использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

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

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–650 нм. Допускается измерение оптической плотности при длине волны 450 нм. Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!

Внести: 100 мкл РРС (лунка А-1);
по 100 мкл K^+ , K^- ;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл анализируемых образцов, предварительно разведенных раствором для предварительного разведения сывороток.

Инкубировать: 30 мин, 37°C.

Промыть: раствором для отмывки планшета, 400 мкл, 5 раз.

Внести: 100 мкл РРК (лунка А-1);
по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Инкубировать: 30 мин, 37°C.

Промыть: раствором для отмывки планшета, 400 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидаина.

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

Внести: по 100 мкл стоп-реактанта.

Измерить: ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–650 нм.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

11.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

11.2. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом $ОП_{ср}(K^-)$ не должно превышать 0,25 ед. опт. плотн.

Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,60 ед. опт. плотн.

Значение оптической плотности в лунке с контролем раствора тетраметилбензидина должно быть не более 0,10 ед. опт. плотн.

11.3. Оценку результатов проводить при условии полного выполнения положений п. 11.2.

11.4. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}K^- + 0,20$$

11.5. Результат анализа считают **положительным**, если $ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$,

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

Результат анализа считают **отрицательным**, если $ОП_{обр} \leq 0,8 \times ОП_{крит}$.

Если $ОП_{обр}$ попадает в интервал от $0,8 \times ОП_{крит}$ до $ОП_{крит}$, то результат анализа **сомни-**

тельный. Рекомендуется повторно проанализировать этот образец параллельно с сывороткой того же больного, полученной через 7–14 дней. Если результат остается сомнительным после повторного исследования, для подтверждения диагноза герпесвирусной инфекции используют другие методы, например, выявление антигена или ДНК ВПГ.

11.6. Факт обнаружения IgM к ВПГ в сыворотке может расцениваться как показатель текущего заболевания. Для постановки окончательного диагноза рекомендуется исследовать кровь, слюну, мочу, ликвор, слезную жидкость, цервикальную жидкость, соскобы – на наличие ДНК ВПГ или антигена ВПГ. Совокупность результатов ИФА, выявления ДНК или антигена ВПГ, клиники и эпидемиологии инфекции позволяет поставить окончательный диагноз герпесвирусной инфекции.

11.7. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации иммуноглобулинов класса М к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

12.1. Набор реагентов «ВектоВПГ-IgM» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (9 мес). Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание набора не допускается.

12.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее **3 мес.** с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности.

12.3. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

**По вопросам, касающимся качества набора реагентов,
следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:**

630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46,
тел./факс (383) 332-67-49,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

20.11.09.

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: www.vector-best.ru