

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации


Г.Г. Онищенко

«01» 12 2008 г.

№ 01-11/183-08

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-Анти-ВПГ-2-G»

**Тест-система иммуноферментная для выявления антител
класса IgG к вирусу простого герпеса 2 типа, набор диагностический**

Набор включает в себя следующие реагенты:

Иммуносорбент – смесь рекомбинантных антигенов ВПГ типа 2, сорбированная в лунках полистироловых 96-луночных разборных планшетов;

Конъюгат (концентрат х 21) – моноклональные антитела мыши против иммуноглобулинов G человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, жидкий;

К+ (контрольный положительный образец) – сыворотка крови человека в разведении 1:10, содержащая специфические антитела класса G к вирусу простого герпеса типа 2, не содержащая HBsAg и антиген p24 ВИЧ-1, антитела к вирусу гепатита С и к ВИЧ- 1,2; инактивированный, жидкий;

К- (контрольный отрицательный образец) - сыворотка крови человека в разведении 1:10, не содержащая специфические антитела к вирусам простого герпеса типов 1 и 2, HBsAg и антиген p24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1,2 и к вирусу гепатита С; инактивированный, жидкий;

БР - блок-раствор для разведения исследуемых образцов;

РРК - раствор для разведения конъюгата;

ПР (концентрат х 25) - промывочный раствор;

СБ - субстратный буферный раствор;

ТМБ - хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, жидкий;

Стоп-реагент – водный раствор серной кислоты 0,75 моль/л.

Набор рассчитан на проведение 96 (8 x 12) определений, включая контрольные. Предназначен для ручной постановки с возможностью дробного 12-ти разового использования по 8 независимых определений, включая контрольные или для одновременной постановки 96 определений, включая контрольные, на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

Описание реагентов набора:

Иммуносорбент - разборный полистироловый 96-луночный планшет с прозрачными бесцветными лунками;

К+ (контрольный положительный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость;

К- (контрольный отрицательный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость;

Конъюгат (концентрат x 21) - прозрачная или слегка опалесцирующая светло-жёлтого цвета жидкость;

РРК - раствор для разведения конъюгата - прозрачная или слегка опалесцирующая желтого цвета жидкость;

БР (блок раствор) - прозрачная фиолетово-синего цвета жидкость, допустимо образование аморфного осадка, при встряхивании распадающегося и приводящего к помутнению раствора;

ПР (концентрат x 25) - промывочный раствор - прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании;

СБ (субстратный буферный раствор) - прозрачная бесцветная жидкость;

ТМБ (хромоген) - прозрачная бесцветная жидкость;

Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость.

Назначение

Набор реагентов предназначен для выявления специфических антител класса G к вирусу простого герпеса типа 2 в сыворотке (плазме) крови человека и определения их титра.

Меры безопасности

Для изготовления контрольных образцов набора используются термоинактивированные сыворотки. При работе с набором в лаборатории с исследуемыми образцами сывороток (плазмы) крови человека следует обращаться, как с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, в спец. одежде, не пипетировать ртом. Твёрдые отходы (использованные планшеты, наконечники к пипеткам, флаконы из-под реагентов, лабораторную посуду и т. д.) следует обеззараживать погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства (СМС) или в 3 % раствор хлорамина Б или другого разрешенного к применению дез. средства. Длительность дезактивации - не менее 1 ч. Твёрдые отходы можно обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывные воды) следует обезвреживать добавлением сухого хлорамина Б из расчёта 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа) и при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.

Способ применения.

Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока их годности!

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при температуре от 20 до 24 °С. Внимание: иммуносорбент необходимо выдержать в закрытом пакете во избежание конденсации влаги внутри лунок!

Для отбора проб использовать калиброванные дозаторы пипеточные с погрешностью измерения не более 5 %.

1. Перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых постановки ИФА

1. Фотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения с настройкой «по воздуху».
2. Вариодозаторы пипеточные одноканальные и многоканальные.
3. Наконечники одноразовые для вариодозаторов.
4. Термостат.
5. Устройство для промывания планшетов (вошер).
6. Вода дистиллированная.
7. Колба мерная.

2. Приготовление рабочих растворов.

Все растворы необходимо отбирать калиброванными дозаторами пипеточными с одноразовыми наконечниками !

Объёмы реагентов для проведения анализа на необходимом количестве стрипов или на целом планшете приведены в таблицах № 1 и 2.

Таблица № 1

Расход реагентов набора при постановке ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа

Рабочий промывочный раствор (ПР)		Рабочий раствор конъюгата		СС	
ПР (конц x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц x 21) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
50,0	1250,0	0,7	14,0	1,2	12,0

Таблица № 2

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов при ручной постановке ИФА

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор (ПР)		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР конц x 25 (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат конц x 21 (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
1	4,0	96,0	0,05	1,0	0,1	1,0

2	8,0	192,0	0,10	2,0	0,2	2,0
3	12,0	288,0	0,15	3,0	0,3	3,0
4	16,0	384,0	0,20	4,0	0,4	4,0
5	20,0	480,0	0,25	5,0	0,5	5,0
6	24,0	576,0	0,30	6,0	0,6	6,0
7	28,0	672,0	0,35	7,0	0,7	7,0
8	32,0	768,0	0,40	8,0	0,8	8,0
9	36,0	864,0	0,45	9,0	0,9	9,0
10	40,0	960,0	0,50	10,0	1,0	10,0
11	44,0	1056,0	0,55	11,0	1,1	11,0
12	50,0	1250,0	0,70	14,0	1,2	12,0

ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимое количество концентрата промывочного раствора отобрать в отдельную ёмкость и развести водой дистиллированной (см. табл. № 1 и № 2). Полученный раствор тщательно перемешать.

Хранение: рабочий промывочный раствор хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С. После вскрытия флакона оставшийся неиспользованным концентрат промывочного раствора хранить во флаконе, плотно закупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

К+ - контрольный положительный образец, готов к применению.

Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным К+ хранить во флаконе, плотно закупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

К- - контрольный отрицательный образец, готов к применению.

Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным К- хранить во флаконе, плотно закупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

БР – блок-раствор для разведения исследуемых образцов, готов к применению. Перед использованием БР тщательно перемешать.

Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным БР хранить во флаконе, плотно укупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

РРК - раствор для разведения конъюгата, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать и отобрать необходимое количество в чистую емкость.

Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным РРК хранить во флаконе, плотно укупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

Конъюгат, рабочий раствор - готовить перед использованием, хранению не подлежит. Перед использованием флакон с концентратом конъюгата тщательно перемешать. Необходимое количество концентрата конъюгата перенести в чистую ёмкость и развести в 21 раз РРК (см. табл. № 1 и № 2). Полученный раствор осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!).

Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным концентрат конъюгата хранить во флаконе, плотно укупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

ТМБ - хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин для приготовления субстратной смеси, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ хранить во флаконе, плотно укупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

СБ - субстратный буферный раствор для приготовления субстратной смеси, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным СБ хранить во флаконе, плотно укупоренном пробкой (закрытом винтовой крышкой), на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

СС - субстратная смесь, готовить перед использованием, хранению не подлежит. Необходимое количество ТМБ перенести в чистую ёмкость и добавить необходимое количество СБ (см. табл. № 1 и № 2). Полученный раствор тщательно перемешать.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

3. Подготовка исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови человека.

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы сывороток термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником. Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 48-х часов. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Ложные результаты могут быть получены с образцами с выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000 – 2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

Образцы с выраженным гемолизом, бактериальным проростом, гиперлипидемией (сильная опалесценция) анализу не подлежат!

4. Ручная постановка ИФА.

4.1. Перед использованием набора необходимо вскрыть фольгированный пакет, вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов. Пакет с неиспользованными стрипами тщательно закрыть (**осушитель не удалять!**). После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 месяца при температуре от 2 до 8 °С.

4.2. Перед использованием необходимое количество стрипов промыть 2 раза рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек и удалить промывочный раствор в ёмкость с дезинфицирующим раствором (например, 3% раствором хлорамина Б, или другим разрешенным Минздравомсоцразвития РФ к применению дез. средством). Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

4.3. При внесении контрольных образцов в зависимости от количества используемых стрипов рекомендуется следующая схема:

- 1 стрип - 1 лунка К+ и 2 лунки К-
- 2 стрипа - 2 лунки К+ и 2 лунки К-
- 3 и более - 2 лунки К+ и 3 лунки К-.

В лунки стрипа, например, А-1 и В-1 дозатором пипеточным внести по 100 мкл К+, в 3 лунки С-1, D-1, Е-1 - по 100 мкл К-. В остальные лунки иммуносорбента внести по 90 мкл блок-раствора и по 10 мкл образцов исследуемых сывороток (конечное разведение исследуемых сывороток 1:10). Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краю планшета или пипетированием, при этом фиолетово-синий цвет должен измениться на голубовато-зеленый. Планшет закрыть крышкой и выдержать 30 мин при температуре 37,0 °С.

4.4. Содержимое лунок удалить в ёмкость с дезинфицирующим раствором и планшет промыть 4 раза рабочим ПР, как в п.4.2.

4.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Планшет закрыть крышкой и выдерживать 30 мин при температуре 37,0 °С.

4.6. Содержимое лунок удалить и планшет промыть 4 раза как в п.4.2.

4.7. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл субстратной смеси и закрытый крышкой планшет выдержать 20 мин в защищенном от света месте при температуре от 20 до 24 °С.

4.8. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 50 мкл стоп-реагента и немедленно провести учет результатов ИФА.

5. Учет результатов

Учет результатов провести спектрофотометрически при двух длинах волн - 450 нм и при референс-длине волны в диапазоне от 620 до 680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм. Реакцию учитывать, если среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с К- не более 0,2, а в лунках с К+ - не ниже 0,6.

ОП крит. рассчитывать по формуле:

$$\text{ОП крит.} = \text{ср. знач. ОП К-} + A$$

где **A** - коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе, величину которого указывают для каждой серии в инструкции по применению, вкладываемой в коробку с набором, и в паспорте на серию данного препарата.

Результаты анализа сывороток считать положительными, если значение ОП исследуемого образца выше ОП критического (ОП крит.).

Результаты анализа сывороток считать отрицательными, если значение ОП исследуемого образца ниже ОП критического (ОП крит.).

6. Набор реагентов «ДС-ИФА-Анти-ВПП-2-G» можно использовать при определении титра антител класса G в сыворотке (плазме) крови человека. Определение титра проводят с помощью расчета индекса антител (ИАТ).

Изотонический раствор натрия хлорида 0,9 % (в состав набора не входит) - используют при определении титра антител. Навеску 0,9 г натрия хлорида растворить в 99,10 мл воды дистиллированной и тщательно перемешать до полного растворения соли. Раствор готовить перед использованием, хранению не подлежит.

6.1. Перед использованием необходимое количество стрипов промыть 2 раза рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек и удалить промывочный раствор в ёмкость с дезинфицирующим раствором.

6.2. В две лунки иммуносорбента дозатором пипеточным внести по 100 мкл К+, в четыре лунки - по 100 мкл К-. В остальные лунки нечетных

стрипов (1, 3, 5, 7, 9, 11) внести по 90 мкл БР и по 10 мкл образцов исследуемых сывороток (сыворотки в лунках разведены в 10 раз). Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краю планшета, при этом фиолетово-синий цвет должен измениться на голубовато-зеленый.

Для расчета ИАТ необходимо исследовать сыворотку в разведении 1:100. Для этой цели в лунки четных стрипов (2, 4, 6, 8, 10, 12) внести по 90,0 мкл 0,9 % изотонического раствора натрия хлорида, затем перенести по 10 мкл разведенных сывороток из лунок нечетных стрипов в соответствующие лунки четных стрипов (сыворотки в лунках разведены в 100 раз) (в качестве примера приведена схема приготовления разведений исследуемых образцов). Планшет закрыть крышкой и выдержать в течение 30 мин при температуре (37,0) °С. Далее постановку ИФА и учет результатов проводить аналогично п.4.3-4.7. и п.5.

Схема приготовления разведений исследуемых образцов (схема приведена для двух образцов)

№ лунки	G 1	G 2	H 1	H 2
БР	90		90	
Изотонический раствор (мкл)	-	90	-	90
Образец (мкл)	10		10	-
Перенос разведённого образца (мкл)		→ 10		→ 10
Разведение	1 : 10	1 : 100	1 : 10	1 : 100
	Образец № 1		Образец № 2	

После учёта результатов исследования сывороток и определения ОПкрит необходимо рассчитать коэффициент позитивности (КП) по формуле:

$$\text{КП} = \text{ОП обр.}(1:100) / \text{ОП крит.}$$

КП используют для вычисления индекса антител (ИАТ), по формуле:

$$\text{ИАТ} = \text{В} \times \text{КП}^2 + \text{С} \times \text{КП} + \text{D},$$

где В, С и D – коэффициенты, определяемые методом статистической обработки результатов ИФА на предприятии-изготовителе, величины которых указывают для каждой серии в инструкции по применению, вкладываемой в коробку с набором реагентов, и в паспорте на серию данного препарата.

Титр антител класса G к ВПГ-2 в исследуемом образце определить по таблице соответствия величины ИАТ титру антител к ВПГ (таблица № 3).

Таблица № 3

Соответствие величин ИАТ титрам антител класса G к ВПГ 2

Значения ИАТ	Титр антител
до 15,0	1/10
15,1-30,0	1/20
30,1-60,0	1/40
60,1-120,0	1/80
120,1-240,0	1/160
240,1-480,0	1/320
480,1-960,0	1/640
960,1-1920,0	1/1280
выше 1920,1	выше 1/1280

Пример. ОП сыворотки, разведённой в 100 раз – 0,850

ОП крит.= 0,22; КП = 0,850/0,22 = 3,86; В = 1,6; С = 32,5; D = 15,0

Вычисляют индекс антител - ИАТ

ИАТ = 1,6 x 3,86² + 32,5 x 3,86 + 15,0 = 164,3 ИАТ = 164,3

По таблице соответствия ИАТ титрам антител определяем титр антител. Величине ИАТ, равной 164,3, соответствует титр 1/160.

При одновременной постановке “парных” сывороток на одном иммуносорбенте достоверным считать изменение (снижение или увеличение) титра антител в 2 раза. При постановке сывороток в динамике на разных иммуносорбентах (особенно в тест-системах разных серий) достоверным считать изменение (снижение или увеличение) титра не менее, чем в 4 раза.

Необходимо учитывать, что титр антител одного и того же образца крови в тест-системах разных производителей может быть различным.

Поэтому исследование сыворотки крови одного больного в динамике должно проводиться в одной тест-системе.

7. Проведение ИФА в автоматическом режиме

на автоматическом анализаторе типа «TECAN Freedom EVOlyser» производства фирмы «TECAN», Австрия (возможна постановка на других моделях ИФА-анализаторах открытого типа).

1. Приготовленный рабочий промывочный раствор заливают в предназначенную для него емкость, остальные рабочие растворы и реагенты помещают в специальные контейнеры, контрольные образцы К⁺ и К⁻, образцы исследуемых сывороток в объеме не менее 300 мкл – во флаконы, которые устанавливают в соответствующие штативы анализатора; помещают в анализатор необходимое количество планшетов с иммуносорбентом.

2. Задают программу проведения ИФА и включают анализатор. По окончании анализа прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов К⁺ и К⁻.

3. Реакцию следует учитывать, если значения оптической плотности (ОП) в лунках с К⁺ не менее 0,6, а среднее значение ОП К⁻ не более 0,2. Далее учет результатов проводить аналогично п 5.

Форма выпуска

•Иммуносорбент.	1 шт.
•Конъюгат (концентрат х 21).	1,0 мл - 1 флакон
•К ⁺ .	1,5 мл - 1 флакон
•К ⁻ .	3,0 мл - 1 флакон
•РРК.	15,0 мл - 1 флакон
•БР.	15,0 мл - 1 флакон
•ПР (концентрат х 25) .	50,0 мл - 1 флакон
•СБ.	15,0 мл - 1 флакон
•ТМБ.	1,5 мл - 1 флакон
•Стоп-реагент.	25,0 мл - 1 флакон

Реагенты помещают в пачку картонную, куда вкладывают инструкцию по применению. Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетами;
- одноразовые наконечники;
- пластиковая ванночка для жидких реагентов;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом.

Срок годности. Условия транспортирования и хранения.

Срок годности набора - 13 мес.

По истечении срока годности набор использованию не подлежит.

Транспортирование наборов должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 сут.

Набор должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Условие отпуска - Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу 119002, Россия, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел.: (495) 241-39-22, факс: (495) 241-92-38 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, Нижний Новгород, ул. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

**Директор по производству
ООО «Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»**



В. К. Пименов