

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления антител к
предранним белкам вируса простого
герпеса первого и второго типов
"БиоСет-актив-ВПГ"

РЗН 2013/670

Е-0672 БиоСет-актив-ВПГ

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «БиоСет-актив-ВПГ» предназначен для выявления антител к ДНК-связывающим белкам ВПГ1 и ВПГ2 в активной стадии герпетической инфекции в сыворотке/плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

На поверхности лунок полистироловых планшетов отдельно адсорбированы: смесь очищенных рекомбинантных полипептидов - аналогов ДНК-связывающих белков ВПГ1, рекомбинантный антиген-аналог ДНК-связывающих белков ВПГ2 и *β*-галактозидаза *E. coli* в качестве контрольного антигена («K_{АГ}»).

Положительный контрольный образец инактивированный K1⁺ представляет собой сыворотку крови человека, содержащую антитела IgG к ДНК-связывающим белкам ВПГ1 и не содержащую антител IgG к ДНК-связывающим белкам ВПГ2, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1 и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от +54 до +56 °С в течение 3 ч.

Положительный контрольный образец инактивированный K2⁺ представляет собой сыворотку крови человека, содержащую антитела IgG к ДНК-связывающим белкам ВПГ2 и не содержащую антител IgG к ДНК-связывающим белкам ВПГ1, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1 и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от +54 до +56 °С в течение 3 ч.

Отрицательный контрольный образец инактивированный K⁻ представляет собой сыворотку крови человека, не содержащую антител IgG к ДНК-связывающим белкам ВПГ1, ВПГ2, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1 и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от +54 до +56 °С в течение 3 ч.

Конъюгат представляет собой моноклональные антитела мыши против IgG человека, связанные с ферментом пероксидазой хрена. Поставляется в виде концентрата.

Раствор № 4 для разведения хромогена содержит субстрат ферментативной реакции.

Хромогеном является 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ).

Стоп-реагент представляет собой 1 М раствор серной кислоты.

Исследуемые сыворотки тестируются одновременно в трех параллельных лунках, в которых отдельно иммобилизованы рекомбинантные антигены-аналоги ДНК-связывающих белков ВПГ1, рекомбинантный антиген-аналог ДНК-связывающих белков ВПГ2 и контрольный антиген. При инкубации образцов сыворотки в лунках планшета специфические к преданным белкам ВПГ1 и ВПГ2 антитела связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя иммунные комплексы антиген-антитело, и не взаимодействуют с контрольным антигеном, иммобилизованным в параллельной лунке. После удаления несвязавшихся антител в лунки добавляют конъюгат - мышинные моноклональные антитела к Fc-фрагменту IgG человека, меченные пероксидазой хрена, - который взаимодействует с комплексом антиген-антитело. После удаления несвязавшегося

конъюгата в лунки планшета добавляют индикаторный раствор, включающий субстрат и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Ферментативная реакция пероксидазы с хромогеном приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации антител, специфических к предранним белкам ВПГ1 и ВПГ2, в образце. После остановки реакции стоп-реагентом интенсивность окрашивания раствора измеряют на спектрофотометре по оптическому поглощению при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм).

2.2. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят следующие компоненты, упакованные в коробку:

Компонент	Описание	Количество
Иммуносорбент	Разборный 96-луночный планшет для иммунологических реакций с прозрачным плоским дном лунок.	1 шт.
Положительный контрольный образец инактивированный K1 ⁺	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость розового цвета.	0,2 мл 1 пробирка
Положительный контрольный образец инактивированный K2 ⁺	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость розового цвета.	0,2мл 1 пробирка
Отрицательный контрольный образец инактивированный K ⁻	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета	0,2 мл 1 пробирка
Конъюгат	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	от 0,5 до 1,5 мл 1 пробирка
Концентрат раствора № 1 для промывания планшетов (×25)	Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре от +35 °С до +37 °С в течение 30 минут.	25 мл 1 флакон
Раствор № 2 для разведения сывороток	Пенящаяся опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	13 мл 1 флакон
Раствор № 3 для разведения конъюгата	Прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	13 мл 1 флакон
Раствор № 4 для разведения хромогена	Прозрачная бесцветная жидкость.	13 мл 1 флакон

Хромоген	Прозрачная бесцветная жидкость.	1,5 мл 1 пробирка
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость.	8 мл 1 пробирка

По запросу клиента набор укомплектовывается дополнительно 1 флаконом концентрата раствора № 1 для проведения анализа на автоматическом ИФА-анализаторе.

Один набор рассчитан на проведение 64 определений при исследовании 32 образцов сыворотки (плазмы), включая контрольные, учитывая одновременное тестирование образца на антитела к ВПГ1 и ВПГ2.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

Чувствительность набора составляет 100 % для положительных сывороток стандартной панели предприятия СПП «БиоСет-актив-ВПГ», содержащих и не содержащих антитела IgG к предранним белкам вируса простого герпеса первого и второго типов. Максимальное разведение стандартного образца предприятия СОП К⁺, при котором регистрируется положительный результат анализа с АгВПГ1, составляет не менее 1:40, с АгВПГ2 - не менее 1:40.

Специфичность набора составляет 100 % для отрицательных сывороток стандартной панели предприятия СПП «БиоСет-актив-ВПГ». Среднее значение оптической плотности при 450 нм для стандартного образца предприятия СОП К⁻ по трем лункам с каждым из антигенов (АгВПГ1 и АгВПГ2 и К_{АГ}) не превышает 0,20 о.е.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Со всеми тестируемыми образцами, сточными растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, следует обращаться как с потенциально инфицированными объектами:

- не пипетировать растворы ртом, при работе использовать индивидуальные средства защиты (резиновые перчатки и защитные очки);
- все отработанные растворы и отходы после завершения анализа обрабатывать в соответствии с установленными нормами безопасности (например, в течение 16-18 часов в растворе гипохлорита натрия в конечной концентрации 1 %);
- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергать автоклавированию в течение 60 мин при +121 °С или сжигать;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-м раствором этилового спирта;
- утилизировать отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- дистиллированная или деионизированная вода;
- дезинфицирующие растворы, соответствующие санитарным требованиям;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;
- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 мл до 5,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- пипетки 8- или 12-канальные автоматические со сменными наконечниками позволяющие отбирать объемы жидкостей от от 10 мкл до 100 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- центрифуга настольная на (3-10) тыс. об/мин для получения и осветления образцов сыворотки/плазмы крови или ликвора в микропробах;
- микропробирки полипропиленовые чистые или планшеты для микротитрования (не использованные ранее!) для предварительного отбора испытуемых образцов;
- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью (1,5-2,2) мл для хранения и осветления образцов сыворотки/плазмы;
- мерный стакан или цилиндр вместимостью (250-500) мл;
- мерная посуда вместимостью до 25 мл;
- ванночки для реагентов или стеклянные чашки Петри;
- воздушный термостат на +37 °С;
- крышки для планшетов или липкая пленка для закрывания планшетов при инкубации;
- аппарат для промывания планшетов;
- спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм);
- контейнер для сброса твердых отходов;
- контейнер для слива использованных жидкостей;
- контейнер для инактивации отходов;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага;
- пленка полиэтиленовая.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для проведения анализа используются образцы сыворотки или плазмы крови человека в объеме 50 мкл.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Следует осветлять образцы, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием (10±1) мин при (2500-3000) об/мин. Собранные образцы сыворотки/плазмы и ликвора хранить при температуре от +4 °С до +6 °С. Если образцы невозможно

протестировать в течение 72 ч, то их следует хранить при температуре не выше -15 °С. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, может привести к получению ложных результатов.

6.1. С целью одновременного внесения испытуемых образцов в рабочий планшет с иммуносорбентом следует предварительно внести по 50 мкл образцов сывороток в лунки дополнительного планшета, не содержащего иммуносорбента.

Каждый исследуемый образец или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

ВНИМАНИЕ!

Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов!

При инкубациях не располагать планшеты стопкой!

Анализ проб следует проводить так, чтобы в случае отсутствия автоматического анализатора на одного оператора одновременно приходилось не более четырех планшетов.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ.

Условия и сроки хранения компонентов набора после вскрытия индивидуальной упаковки приведены в таблице № 1:

Таблица № 1.

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	от +2 °С до +8 °С в плотно закрытом пакете	8 недель
K1 ⁺ , K2 ⁺ , K ⁻ , конъюгат, концентрат раствора № 1, растворы № 2, № 3, № 4, хромоген	от +2 °С до +8 °С	8 недель
Стоп-реагент	от +2 °С до +8 °	до окончания срока годности набора

Перед началом работы набор необходимо выдержать при комнатной температуре 30 минут.

Растворы № 2, № 3, K1⁺, K2⁺, K⁻, стоп-реагент поставляются в готовом виде. Перед использованием флаконы с растворами № 2 и № 3, пробирки с контрольными образцами K1⁺, K2⁺, K⁻ интенсивно встряхнуть.

7.1. Приготовление рабочего раствора № 1 для промывания планшетов.

Содержимое флакона с концентратом раствора № 1(×25) для промывания планшетов перемешать. При выпадении в концентрате кристаллов его следует прогреть перед разведением при температуре от +35 до +37 °С до полного растворения.

7.1.1. Для приготовления рабочего раствора № 1 при использовании цельного планшета отобрать из флакона 12 мл в чистую емкость и довести объем деионизированной водой до 300 мл. Тщательно перемешать.

7.1.2. Для приготовления рабочего раствора № 1 из расчета на модуль из 3-х стрипов планшета (24 лунки) отобрать из флакона 6 мл в чистую емкость и довести объем деионизированной водой до 150 мл. Тщательно перемешать.

Готовый раствор хранить не более 24 ч при температуре от +4 °С до +12 °С или 4 часа при температуре от +18 °С до +24 °С.

7.2. Приготовление рабочего разведения конъюгата.

7.2.1. Указанные в данном пункте объемы конъюгата относятся к наборам **серии 67**. Для приготовления рабочего разведения конъюгата при использовании цельного планшета из пробирки с концентратом конъюгата отобрать 400¹ мкл в чистую емкость и добавить 12 мл раствора № 3.

7.2.2. Для приготовления рабочего разведения конъюгата из расчета на модуль из трех стрипов из пробирки с концентратом конъюгата отобрать 100 мкл в чистую емкость и добавить 3 мл раствора № 3.

Тщательно перемешать, не допуская образования пены.

Готовый раствор конъюгата хранить не более 15 мин при температуре от +9 °С до +25 °С в защищенном от света месте.

7.3. Приготовление индикаторного раствора.

7.3.1. Для приготовления индикаторного раствора при использовании цельного планшета отобрать 10 мл раствора № 4 в чистую посуду и добавить 1 мл хромогена.

7.3.2. Для приготовления индикаторного раствора из расчёта на модуль из трех стрипов планшета отобрать 3,0 мл раствора № 4 в чистую посуду и добавить 0,3 мл хромогена.

Тщательно перемешать.

Готовить непосредственно перед использованием в защищенном от света месте, избегая контакта с металлами и ионами металлов.

Готовый раствор хранению не подлежит.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором хромогена, буферной смесью с гидроперитом и индикаторным раствором, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе пероксидазной реакции. Избегать также контакта раствора хромогена с металлом.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Освободить планшет из упаковки и оставить в каретке необходимое количество стрипов. Остальные стрипы поместить обратно в пакет и хранить в соответствии с условиями, указанными в таблице № 1.

8.1. Во все лунки планшета внести по 90 мкл раствора № 2.

8.1.1. В случае использования цельного планшета.

¹ Объем отбираемого раствора индивидуален для каждой серии набора и указан в Инструкции, вкладываемой в наборы соответствующей серии.

По 10 мкл каждой испытуемой сыворотки внести в три лунки горизонтального ряда, как показано на рис. 1. В лунки E10, 11 и 12 внести по 10 мкл контрольной сыворотки K1⁺; в лунки F10, 11 и 12 внести по 10 мкл контрольной сыворотки K2⁺; в лунки G10, 11 и 12 внести по 10 мкл контрольной сыворотки K⁻. В лунки H10, 11 и 12 сывороток не вносить (контроль конъюгата).

Рис. 1

	А _Г ВПГ1	А _Г ВПГ2	К _{АГ}	А _Г ВПГ1	А _Г ВПГ2	К _{АГ}	А _Г ВПГ1	А _Г ВПГ2	К _{АГ}	А _Г ВПГ1	А _Г ВПГ2	К _{АГ}
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	№1	№1	№1	№9	№9	№9	№17	№17	№17	№25	№25	№25
B	№2	№2	№2	№10	№10	№10	№18	№18	№18	№26	№26	№26
C	№3	№3	№3	№11	№11	№11	№19	№19	№19	№27	№27	№27
D	№4	№4	№4	№12	№12	№12	№20	№20	№20	№28	№28	№28
E	№5	№5	№5	№13	№13	№13	№21	№21	№21	K1+	K1+	K1+
F	№6	№6	№6	№14	№14	№14	№22	№22	№22	K2+	K2+	K2+
G	№7	№7	№7	№15	№15	№15	№23	№23	№23	K-	K-	K-
H	№8	№8	№8	№16	№16	№16	№24	№24	№24	KK	KK	KK

8.1.2. В случае использования отдельных модулей из трех стрипов планшета (Рис. 2).

Рис. 2

	А _Г ВПГ1	А _Г ВПГ2	К _{АГ}	А _Г ВПГ1	А _Г ВПГ2	К _{АГ}	А _Г ВПГ1	А _Г ВПГ2	К _{АГ}	А _Г ВПГ1	А _Г ВПГ2	К _{АГ}
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	№1	№1	№1	№5	№5	№5	№9	№9	№9	№13	№13	№3
B	№2	№2	№2	№6	№6	№6	№10	№10	№10	№14	№14	№14
C	№3	№3	№3	№7	№7	№7	№11	№11	№11	№15	№15	№15
D	№4	№4	№4	№8	№8	№8	№12	№12	№12	№16	№16	№16
E	K1+	K1+	K1+									
F	K2+	K2+	K2+									
G	K-	K-	K-									
H	KK	KK	KK									

По 10 мкл каждой испытуемой сыворотки внести в три лунки горизонтального ряда, как показано на рис. 2. В лунки E1, E2 и E3 внести по 10 мкл контрольной сыворотки K1⁺; в лунки F1, F2 и F3 внести по 10 мкл контрольной сыворотки K2⁺; в лунки G1, G2 и G3 внести по 10 мкл контрольной сыворотки K⁻. В лунки H1, H2 и H3 сывороток не вносить (контроль конъюгата).

Перемешать содержимое лунок пипетированием или на встряхивателе.

Планшет накрыть чистой сухой крышкой или заклеить пленкой и выдержать в течение 30 минут при температуре (+37±1) °С.

Полезно поместить каждый планшет в полиэтиленовый пакет. Это обеспечит одинаковую влажность и позволит избежать краевых эффектов.

8.2. Промывание.

Удалить жидкость из лунок с помощью промывателя. Промыть лунки планшета 5-кратно рабочим раствором № 1 (см. п. 7.1.), внося в лунки по 250 мкл раствора и выдерживая его в лунках не менее 20 секунд. После промывания тщательно удалить влагу из планшета, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

8.3. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (п. 7.2.). Планшет закрыть сухой крышкой или заклеить новым листом пленки и выдержать в течение 30 мин при температуре (+37±1) °С.

8.4. Промывание. Повторите процедуры, описанные в п. 8.2.

ВНИМАНИЕ! Недостаточное промывание планшетов может привести к получению ложных результатов.

8.5. В каждую лунку планшета внести по 100 мкл индикаторного раствора (п. 7.3.). Планшет поместить в защищенное от света место на 15 мин при температуре от +15 °С до +25 °С.

8.6. Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и немедленно провести учет результатов.

9. РЕГИСТРАЦИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение оптической плотности (ОП) проводить при длине волны 450 нм.

Рекомендуемая длина волны сравнения (620-650) нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9.1. Учет результатов исследования проводить при условии, что средние значения ОП при тестировании контрольных образцов удовлетворяют следующим требованиям:

ОП _{СР} К1 ⁺ по Аг ВПГ1	не менее 0,80
ОП _{СР} К1 ⁺ по Аг ВПГ2	не более 0,30
ОП _{СР} К2 ⁺ по Аг ВПГ1	не более 0,30
ОП _{СР} К2 ⁺ по Аг ВПГ2	не менее 0,80
ОП _{СР} К1 ⁺ по К _{АГ}	не более 0,30
ОП _{СР} К2 ⁺ по К _{АГ}	не более 0,30
ОП _{СР} К ⁻ по каждому из антигенов: Аг ВПГ1, Аг ВПГ2, К _{АГ}	не более 0,30
ОП _{СР} КК по каждому из антигенов: Аг ВПГ1, Аг ВПГ2, К _{АГ}	не более 0,15

При получении иных показателей исследование повторить.

9.2. Для каждого исследуемого образца определить «величины превышения» - между ОП по Аг ВПГ1 и ОП по К_{АГ} (А1) и, соответственно, между ОП по Аг ВПГ2 и ОП по К_{АГ} (А2) по формулам:

$$A1 = ОП_{АгВПГ1} - ОП_{КАГ}$$

$$A2 = ОП_{АгВПГ2} - ОП_{КАГ}$$

Результат исследования считается **положительным**, если «величина превышения» для исследуемого образца не ниже значения А критического (А_{КРИТ})²⁾.

Результат исследования считается **отрицательным**, если «величина превышения» для исследуемого образца ниже А_{КРИТ}.

$$A_{КРИТ} = 0,350.$$

Пример:

Допустим, что величина А_{КРИТ} для данной серии наборов составляет 0,350.

1) Для образца сыворотки № 1 получены следующие значения:

$$ОП \text{ по Аг ВПГ1} - 0,225$$

$$ОП \text{ по Аг ВПГ2} - 0,186$$

$$ОП \text{ по К}_{АГ} - 0,150$$

$$A1 = 0,225 - 0,150 = 0,075$$

Результат отрицательный

$$A2 = 0,186 - 0,150 = 0,036$$

Результат отрицательный

2) Для образца сыворотки № 2 получены следующие значения:

$$ОП \text{ по Аг ВПГ1} - 0,700$$

$$ОП \text{ по Аг ВПГ2} - 0,800$$

²⁾ значение А_{КРИТ} индивидуально для каждой серии набора и указано в Инструкции, вкладываемой в наборы соответствующей серии, и в паспорте на серию.

ОП по K_{AG} - 0,210

$A1 = 0,700 - 0,210 = 0,490$

Результат положительный

$A2 = 0,800 - 0,210 = 0,590$

Результат положительный

Примечание. Если ОП исследуемого образца в лунке с K_{AG} превышает 0,3 о.е., то это означает, что образец дает неспецифическую реакцию из-за наличия большого количества антител к бактериальным антигенам или вследствие несоблюдения правил приготовления и хранения сывороток. В этом случае результат является неопределенным и необходимо повторно взять кровь и провести исследование второго образца одновременно с первым. При повторном неопределенном результате образец следует исследовать другими методами.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор транспортируют и хранят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от +2 °С до +8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование в течение 3 суток при температуре от +9 °С до +30 °С.

Условия отпуска: для диагностики *in vitro* в лечебно-профилактических и санитарно-противоэпидемиологических учреждениях.

Рекламации на качество набора необходимо направлять в ЗАО БТК «Биосервис» по адресу: 115088, г. Москва, а/я 20, тел./факс (495) 674-5605.

11. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ДЛЯ ЗАМЕТОК