«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«26» ____05____ 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения индекса авидности иммуноглобулинов класса G к вирусу простого герпеса 2 типа в сыворотке (плазме) крови

(ВектоВПГ-2-IgG-авидность)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВектоВПГ-2-IgG-авидность (далее по тексту - набор) предназначен для определения индекса авидности иммуноглобулинов класса G к вирусу простого герпеса 2 типа в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Определение индекса авидности иммуноглобулинов класса G к вирусу простого герпеса 2 типа позволяет уточнить сроки инфицирования и дифференцировать первичную герпетическую инфекцию от хронической и паст-инфекции.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 48 исследуемых образцов, включая контроли. Дробное использование набора позволяет проведение 6 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением очищенного рекомбинантного белка gG ВПГ-2 и моноклональных антител. На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках параллельных рядов с иммобилизованным антигеном ВПГ-2. Антитела к gG ВПГ-2 связываются с иммобилизованным антигеном, формируя комплекс «антиген-антитело». На второй стадии, после внесения белок-диссоциирующего агента в один из параллельных рядов, происходит диссоциация комплексов «антиген-антитело», включающих IgG с более низкими константами связывания (низкой авидностью). На третьей стадии связавшиеся антитела взаимодействуют с конъюгатом моноклональных

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

антител против IgG человека с пероксидазой хрена. Комплекс «антиген–антитело–конъюгат» выявляется реакцией с субстратом пероксидазы – перекисью водорода и хромогеном – тетраметилбензидином. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках стрипов. Интенсивность окраски пропорциональна количеству связанных в комплекс IgG к gG ВПГ-2 в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок рекомбинантным белком gG ВПГ-2, готовый для использования – 1 шт.;

– положительный контрольный образец ($К^{+}_{ВА}$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий высокоавидные IgG к ВПГ-2, готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);

– положительный контрольный образец ($К^{+}_{НА}$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий низкоавидные IgG к ВПГ-2; готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);

– отрицательный контрольный образец ($К^{-}$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к ВПГ-2, готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);

– конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Тх25) – 2 флакона (по 28 мл);

– раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) - 1 флакон (10 мл);

– раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12 мл);

– раствор сравнения (РС) – 1 флакон (8,0 мл);

– раствор белок-диссоциирующего агента (БДА) – 1 флакон (8,0 мл);

– раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– стоп-реагент – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

– пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;

– ванночками для реагентов – 2 шт.;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– наконечниками для пипетки на 5-200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляются:

– планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления низкоавидных иммуноглобулинов класса G к ВПГ 2 – соответствие результатов определения набором низкоавидных иммуноглобулинов класса G к ВПГ-2 требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-224), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%.

3.2. Специфичность выявления высокоавидных иммуноглобулинов класса G к ВПГ-2 – соответствие результатов определения набором высокоавидных иммуноглобулинов класса G к ВПГ-2 требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-224), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора 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 поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г. и в методических указаниях МУ-287-113 (утвержденных Департаментом госсанэпиднадзора МИНЗДРАВА РФ от 30.12.1998 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2, деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;

– термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;

– холодильник бытовой;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл (погрешность не более 5%);

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл (погрешность не более 5%);

– промывочное устройство для планшетов;

– перчатки резиновые хирургические;

– флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

минус 20°С (и ниже) не более 6 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 (плазмы) крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °С не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 суток.

7.4. Подготовка контрольных образцов.

Контрольные образцы ($К^{+}_{ВА}$, $К^{+}_{НА}$, $К^{-}$) готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.5. Предварительное разведение исследуемых образцов.

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать. При разведении сыворотки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

красный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет образца меняется незначительно.

Хранить не более 3 ч при температуре от 18 до 25 °С.

7.6. Приготовление конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в пластиковую ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор конъюгата утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в пластиковую ванночку для реагента и поместить в защищенное от света место.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

Оставшийся после проведения ИФА раствор тетраметилбензидина утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).

Раствор ТМБ после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

7.9. Внесение контрольных образцов и исследуемых сывороток

В лунки стрипов внести попарно по 100 мкл контрольных образцов для прямого (нечетные стрипы) и диссоциирующего (четные стрипы) ИФА. Например, в лунки A-1, A-2 и B-1, B-2 – $К^{-}$, в лунки C-1, C-2 – $К^{+}_{НА}$, в лунки и D-1, D-2 – $К^{+}_{ВА}$. В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток, затем попарно в соседние лунки двух стрипов внести по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток, тщательно перемешать. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 100 раз (см. схему).

Раствор для разведения сывороток перед употреблением встряхнуть!

Схема

	1	2	3	4	5	6
A	$К^{-}$	$К^{-}$	сыв. 5	сыв. 5		
B	$К^{-}$	$К^{-}$	сыв.6	сыв.6		
C	$К^{+}_{НА}$	$К^{+}_{НА}$	сыв.7	сыв.7		
D	$К^{+}_{ВА}$	$К^{+}_{ВА}$	сыв. 8	сыв. 8		
E	сыв.1	сыв.1	сыв.9	сыв.9		
F	сыв. 2	сыв. 2	сыв. 10	сыв. 10		
G	сыв.3	сыв.3	сыв.11	сыв.11		
H	сыв.4	сыв.4	сыв. 12	сыв. 12		
	РС	БДА	РС	БДА		

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок планшета.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37±1 °С.

7.10. По окончании инкубации снять липкую пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 2 раза промывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.11. Во все лунки нечетных стрипов (для прямого ИФА) внести по 100 мкл раствора сравнения. Во все лунки четных стрипов (для диссоциирующего ИФА) внести по 100 мкл белок-диссоциирующего агента.

Заклеить планшет пленкой и инкубировать в течение 15 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7.12. По окончании инкубации содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 3 раза промывочным раствором, как описано в п. 7.10.

7.13. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата (п. 7.6.). Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37±1 °С.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.14. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 5 раз, так как описано в п. 7.10.

7.15. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

Планшет выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.16. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620 - 655 нм. Допускается измерение оптической плотности при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху).

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) в прямом ИФА:

$$ОП_{крит.}=ОП_{ср}К^{-}_{прямогоИФА} + 0,2.$$

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Результат анализа считать положительным, если $ОП_{прям.ИФА} \geq ОП_{крит}$, где $ОП_{прям.ИФА}$ – оптическая плотность исследуемого образца в прямом ИФА.

Результат анализа считать отрицательным, если $ОП_{прям.ИФА} < ОП_{крит}$

Если ОП сыворотки в прямом ИФА превышает $ОП_{крит.}$, то индекс авидности (ИА) вычисляется по формуле:

$$ИА = \frac{ОП_{диссоциирующегоИФА}}{ОП_{прямогоИФА}} \times 100\ \%.$$

9.1.1. Среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,25 ($ОП_{ср}К^{-}_{(прямой\ ИФА)} < 0{,}25$).

Значение индекса авидности $К^{+}_{ВА}$ должно быть более 50% (ИА $К^{+}_{ВА} > 50\%$);

Значение индекса авидности $К^{+}_{НА}$ должно быть менее 40% (ИА $К^{+}_{НА} < 40\ \%$).

Только в случае соблюдения указанных условий можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.2. Рассчитать индексы авидности исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови по формуле (см п. 9.1.).

9.3. Значение ИА < 40 % указывает на наличие низкоавидных антител;

значение ИА > 50% указывает на наличие высокоавидных антител;

значение ИА в интервале 40-50 % – пограничный результат.

Для образцов с ОП близкой к $ОП_{крит.}$ (в пределах от $ОП_{крит}$ до 1,5 х $ОП_{крит}$) ошибка в определении индекса авидности может быть достаточно велика. Сыворотки от таких пациентов необходимо исследовать в динамике.

Если ОП исследуемой сыворотки выше 3 о.е., возможна ошибка в определении ИА. С целью правильного определения индекса авидности специфических иммуноглобулинов в таких сыворотках (особенно при наличии в сыворотке специфических IgM) измерить величину оптической плотности в лунках стрипов на длине волны 405 нм (референс-волна остается неизменной – 620–655 нм). Такой порядок учета результатов позволит не пропустить слабоположительные сыворотки (регистрация ОП на 450 нм), а индекс авидности сильноположительных сывороток можно будет рассчитать по оптической плотности, измеренной на длине волны 405 нм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор сравнения, раствор белок-диссоциирующего агента и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– контрольные образцы, конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор для предварительного разведения сывороток), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «ВектоВПГ-2-IgG-авидность», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru