

## **ИНСТРУКЦИЯ**

по применению набора реагентов для выявления низкоавидных IgG-антител к вирусу простого герпеса в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа

"БиоПрайм-ВПГ"

**РЗН 2013/672**

**Е-0663 БиоПрайм-ВПГ**

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «БиоПрайм-ВПГ» предназначен для выявления низкоавидных IgG-антител к вирусу простого герпеса в сыворотке/плазме крови человека методом иммуноферментного анализа с целью диагностики первичной инфекции. Наличие низкоавидных антител является индикатором первичной инфекции в предшествующие 2-3 месяца.

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Для определения индекса авидности антител IgG каждый образец сыворотки или плазмы крови человека исследуют методом иммуноферментного анализа в двух параллельных лунках планшетов с иммобилизованными антигенами вируса простого герпеса. При этом антитела, специфичные к белкам вируса простого герпеса, взаимодействуют с адсорбированными антигенами, образуя иммунные комплексы. После однократной отмывки несвязавшихся антител в контрольные лунки (К-лунки) вносят фосфатный буфер, в опытные (ДР-лунки) - денатурирующий раствор, который вызывает диссоциацию комплексов низкоавидных антител с антигеном. Степень диссоциации зависит от авидности антител в исследуемом образце. После отмывки в лунки добавляют конъюгат - мышинные моноклональные антитела к Fc-фрагменту IgG человека, меченные пероксидазой хрена, - который взаимодействует с комплексом антиген-антитело. Отмыв несвязавшуюся часть конъюгата, в лунки планшета вносят индикаторный раствор, включающий субстрат и хромоген. Содержащийся в конъюгате фермент катализирует разложение субстрата, что приводит к образованию окрашенного продукта,

интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию антител IgG к вирусу простого герпеса в исследуемом образце. По окончании реакции измеряют оптическое поглощение растворов в лунках при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм). На присутствие в исследуемом образце низкоавидных антител указывает снижение оптического поглощения в лунке, обработанной денатурирующим раствором, в сравнении с контрольной лункой.

### 2.2. СОСТАВ НАБОРА

Набор выпускается в виде реагентов, упакованных в коробку:

Компонент	Описание	Количество
Иммуносорбент	Разборный 96-луночный планшет для иммунологических реакций с прозрачным плоским дном лунок.	1 шт.
Высокоавидный положительный контрольный образец инактивированный, K <sup>+</sup> <sub>ВАТ</sub>	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.	1,5 мл 1 пробирка
Низкоавидный	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость	1,5 мл

положительный контрольный образец инактивированный, K <sup>+</sup> <sub>НАТ</sub>	красного цвета.	1 пробирка
Отрицательный контрольный образец инактивированный, K <sup>-</sup>	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета.	1,5 мл 1 пробирка
Конъюгат	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.	15 мл 1 флакон
Концентрат раствора № 1 для промывания планшетов (×25)	Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре (35-37)° С в течение 30 мин.	25 мл 2 флакона
Раствор № 2 для разведения сывороток	Прозрачная или опалесцирующая пенящаяся жидкость синего цвета, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	26 мл 1 флакон
Денатурирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость, при хранении возможно выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре (35-37)° С в течение 30 мин.	8 мл 1 пробирка
Фосфатный буфер	Прозрачная бесцветная жидкость.	8 мл 1 пробирка
Раствор № 4 для разведения хромогена	Прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл 1 флакон
Хромоген	Прозрачная бесцветная жидкость.	1,5 мл 1 пробирка
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость.	8 мл 1 пробирка
Планшет для предварительного разведения образцов	Цельный или разборный 96-луночный планшет с прозрачным плоским дном лунок	1 шт.
Пленка для заклеивания планшета	Самоклеющаяся влагонепроницаемая пленка	3 шт.
Ванночка для разведения реагентов	Ванночка из поливинилхлорида для 8-канального дозатора	2 шт.

Набор рассчитан на проведение 48 анализов, включая контрольные.

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Чувствительность набора по сывороткам стандартной панели предприятия СПП «БиоПрайм-ВПГ», содержащим низкоавидные IgG, составляет 100 %.

Специфичность набора по сывороткам стандартной панели предприятия СПП «БиоПрайм-ВПГ», не содержащим низкоавидные IgG, составляет 100 %.

### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Со всеми тестируемыми образцами, отработанными растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, необходимо 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 автоклавировать в течение 60 мин при 121 °С или сжигать;

- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-м раствором этилового спирта;

- утилизировать отходы, в соответствии с требованиями СП 1.3.2322 - 08 (Санитарно - эпидемиологические правила "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней"), соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

### 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.

Для проведения анализа необходимо использовать:

- дистиллированную или деионизованную воду;
- дезинфицирующие растворы, соответствующие санитарным требованиям;
- резиновые перчатки;
- раствор спирта этилового 70 %;
- пипетки одноканальные автоматические вместимостью от 5 мкл до 1000 мкл;
- пипетки 8- или 12-канальные вместимостью от 50 мкл до 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые вместимостью 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые вместимостью 1000 мкл;
- центрифугу настольную на  $(3-10) \times 10^3$  об/мин;
- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью (1,5-2,2) мл для хранения и осветления образцов сыворотки;
- пробирки полипропиленовые вместимостью (1,0-2,0) мл;
- мерные стаканы или цилиндры вместимостью 250 мл и 500 мл;
- воздушный термостат на 37° С;
- спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при длине волны 450 нм (длине волны сравнения - 620-650 нм);
- контейнер для сбора твердых отходов;

- автоклав для дезинфекционной обработки расходных материалов после проведения исследования;
- контейнер для слива отработанных жидкостей;
- фильтровальную бумагу;
- пленку полиэтиленовую.

Рекомендуется использовать аппарат для автоматического промывания планшетов и встряхиватель для перемешивания содержимого флаконов и пробирок.

## **6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

Для исключения ложных результатов подготовку исследуемых образцов осуществлять в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, осветлять центрифугированием. Собранные образцы сывороток или плазмы хранить при температуре от 4 °С до 6 °С. Если образцы невозможно протестировать в течение 72 ч, то хранить их при температуре не выше минус 15 °С. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

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

### **6.1. Подготовка испытуемых образцов сывороток.**

Испытуемые образцы сывороток развести в 10 раз раствором № 2 в лунках планшета для предварительного разведения образцов, перемешать с помощью встряхивателя или пипетированием.

Разведенные испытуемые образцы сывороток не хранить!

**Каждый образец сыворотки или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.**

**ВНИМАНИЕ!** Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов! Анализ проб следует проводить так, чтобы на одного оператора одновременно приходилось не более одного набора.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ (для проведения 8 анализов)

Условия и сроки хранения вскрытых компонентов набора приведены в таблице № 1.

Таблица № 1.

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	от 2 до 8 °С в плотно закрытом пакете	8 недель
K <sup>+</sup> <sub>ВАТ</sub> , K <sup>+</sup> <sub>НАТ</sub> , K <sup>-</sup> , конъюгат, концентрат раствора № 1, растворы № 2, № 4, денатурирующий раствор, фосфатный буфер, хромоген	от 2 до 8 °С	8 недель
Стоп-реагент	от 2 до 8 °С	до окончания срока годности набора

Перед началом работы набор выдержать при комнатной температуре 30 минут.

Раствор № 2, денатурирующий раствор, фосфатный буфер, стоп-реагент, конъюгат, K<sup>+</sup><sub>ВАТ</sub>, K<sup>+</sup><sub>НАТ</sub> и K<sup>-</sup> готовы к применению.

В растворе № 2, возможно выпадение рыхлого комкующегося осадка, перед использованием содержимое флакона с раствором № 2 необходимо интенсивно встряхнуть до исчезновения осадка.

Содержимое флакона с денатурирующим раствором интенсивно встряхнуть, а при выпадении осадка выдержать при температуре от 35 до 37 °С в течение 30 мин до полного растворения.

K<sup>+</sup><sub>ВАТ</sub>, K<sup>+</sup><sub>НАТ</sub> и K<sup>-</sup> перед использованием обязательно перемешать.

#### 7.1.1. Приготовление рабочего раствора № 1 для промывания планшетов.

Содержимое флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхнуть. При выпадении в концентрате кристаллов прогреть его при температуре от 35 °С до 37 °С до полного растворения. 4 мл концентрата раствора № 1 перенести в мерную емкость, довести объем до метки 100 мл дистиллированной водой и 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.

#### 7.1.2. Приготовление индикаторного раствора.

За 5-10 мин до окончания реакции с конъюгатом приготовить рабочее разведение хромогена. Отобрать 2 мл раствора № 4, поместить в чистую емкость и добавить 0,2 мл хромогена в расчете на 2 стрипа. Тщательно перемешать.

**ВНИМАНИЕ!** Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с хромогеном, раствором № 4 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 этих реагентов с металлами.

### 7.2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ

7.2.1. Иммуносорбент освободить от упаковки, в каретке оставить четное количество стрипов, необходимое для проведения анализа. Остальные стрипы

поместить обратно в пакет и хранить в соответствии с условиями, указанными в таблице № 1.

**7.2.2. Внесение испытуемых и контрольных образцов сывороток.**

Все образцы исследовать в двух параллельных лунках: К-лунке и ДР-лунке.

Внести по 100 мкл К<sup>-</sup>, К<sup>+ВАТ</sup>, К<sup>+НАТ</sup>, в две соседние лунки 2-х вертикальных рядов

планшета в соответствии со схемой, представленной на рис.1. В остальные лунки внести по 90 мкл раствора № 2.

Внести по 10 мкл предварительно подготовленных (п. 6.1.) испытуемых образцов сывороток в каждые две соседние лунки 2-х вертикальных рядов планшета в соответствии со схемой, представленной на рис.1.

Рис.1. Схема внесения контрольных и испытуемых образцов сывороток.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>А</b>	К <sup>-</sup>	К <sup>-</sup>	№6	№6	№14	№14	№22	№22	№30	№30	№38	№38
<b>В</b>	К <sup>+ВАТ</sup>	К <sup>+ВАТ</sup>	№7	№7	№15	№15	№23	№23	№31	№31	№39	№39
<b>С</b>	К <sup>+НАТ</sup>	К <sup>+НАТ</sup>	№8	№8	№16	№16	№24	№24	№32	№32	№40	№40
<b>Д</b>	№1	№1	№9	№9	№17	№17	№25	№25	№33	№33	№41	№41
<b>Е</b>	№2	№2	№10	№10	№18	№18	№26	№26	№34	№34	№42	№42
<b>Ф</b>	№3	№3	№11	№11	№19	№19	№27	№27	№35	№35	№43	№43
<b>Г</b>	№4	№4	№12	№12	№20	№20	№28	№28	№36	№36	№44	№44
<b>Н</b>	№5	№5	№13	№13	№21	№21	№29	№29	№37	№37	№45	№45
	К - лунки	ДР - лунки	К - лунки	ДР - лунки	К - лунки	ДР - лунки	К - лунки	ДР - лунки	К - лунки	ДР - лунки	К - лунки	ДР - лунки

Планшет заклеить пленкой (или закрыть крышкой) и выдержать в течение (60±2) мин при температуре (37±1)°С.

**7.2.3. Промывание.**

Удалить жидкость из лунок автоматическим или ручным промывателем.

Планшет **однократно** промыть рабочим раствором № 1 (см. п. 7.1.1.), внося в лунки по 250 мкл промывающего раствора и выдерживая его в лунках не менее 20 с. После промывания тщательно удалить остатки влаги из планшета, постукивая планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

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

**7.2.4.** Во все К-лунки (ряды планшета №№ 1, 3, 5, 7, 9, 11) внести по 150 мкл фосфатного буфера, во все ДР-лунки (ряды планшета №№ 2, 4, 6, 8, 10, 12) - по 150 мкл денатурирующего раствора. Выдержать в течение 10 мин при температуре от 18 °С до 25 °С.

**7.2.5.** Повторить **пятикратно** процедуры промывания, описанные в п. 7.2.3.

**7.2.6.** Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата. Планшет заклеить пленкой (или закрыть крышкой) и выдержать в течение (30±2) мин при температуре (37±1) °С.

**7.2.7.** Повторить **пятикратно** процедуры промывания, описанные в п. 7.2.3.

7.2.8. Во все лунки планшета внести 100 мкл индикаторного раствора (п. 7.1.2.). Планшет поместить в защищенное от света место на  $(15 \pm 2)$  мин при температуре  $(18-25)$  °С.

Не располагать планшеты стопкой!

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

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение оптической плотности (ОП) провести при длине волны 450 нм. Рекомендованная длина волны сравнения (620-650) нм. Вывести спектрофотометр на нулевой уровень («бланк») по воздуху.

8.1. Результаты измерения, полученные при анализе контрольных образцов, должны удовлетворять следующим требованиям:

ОП в К-лунке с $K^-$	не более 0,15 о.е.;
ОП в К-лунке с $K^+_{\text{ВАТ}}$	не менее 0,80 о.е.;
ОП в К-лунке с $K^+_{\text{НАТ}}$	не менее 0,80 о.е.

В том случае, если ОП испытуемого образца в контрольной лунке выше 1,9 о.е., провести повторное исследование образца крови в более высоком разведении.

В случае, если ОП испытуемого образца в К-лунке ниже 0,5 о.е., провести исследование образца крови, повторно взятого у пациента через 7-10 суток.

Вычислить индекс avidности (ИА) для контрольных образцов  $K^+_{\text{ВАТ}}$  и  $K^+_{\text{НАТ}}$  и испытуемых сывороток по формуле:

$$IA = (OP_{\text{ДР-лунка}} / OP_{\text{К-лунка}}) \times 100 \%$$

где:  $OP_{\text{ДР-лунка}}$  - ОП образца, обработанного ДР,

$OP_{\text{К-лунка}}$  - ОП образца в К-лунке.

ИА  $K^+_{\text{ВАТ}}$  должен быть не менее **60 %**.

ИА  $K^+_{\text{НАТ}}$  должен быть не более **50 %**.

При получении иных показателей исследование повторить.

8.2. Вычислить ИА для исследуемых образцов по приведенной формуле (п. 8.1.).

По значению индекса avidности определить присутствие в испытуемом образце низкоавидных антител:

ИА < 50 % указывает на наличие антител с низкой avidностью;

ИА от 50 % до 60 % свидетельствует о выявлении антител с неопределенной avidностью (пограничный результат).

Наличие высокоавидных антител не исключает возможность недавней инфекции.

Наличие низкоавидных антител является индикатором первичной инфекции в предшествующие 2-3 месяца.

В случае неопределенного результата рекомендуется не ранее, чем через 7 суток повторно взять кровь и провести исследование второго образца одновременно с первым.



Примечание: для установления диагноза следует учитывать как данные результатов лабораторных исследований, так и всю сумму клинических проявлений и эпидемиологического анамнеза.

## **9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

Набор транспортировать и хранить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 °С до 8 °С. Не допускать замораживания. Допускается транспортирование в течение 3 сут 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 направлять в ЗАО БТК «Биосервис» по адресу: 115088, г. Москва, а/я 20, тел./факс (495) 674-5605.

## **10. СРОК ГОДНОСТИ**

Срок годности набора 12 месяцев. Запрещается применять набор и его компоненты после окончания срока годности набора.

**ДЛЯ ЗАМЕТОК**