

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления антител к вирусу
простого герпеса первого и второго
типов "БиоСкрин-ВПГ"

Е-0644 БиоСкрин-ВПГ

Настоящая инструкция распространяется на тест-систему иммуноферментную "БиоСкрин-ВПГ" для выявления антител к вирусу герпеса простого (ВПГ) 1 и 2 типов, включающую следующие компоненты:

1) **иммуносорбент** - полистироловые планшеты для иммунологических реакций, в лунках которых сорбированы антигены вируса герпеса простого (АгВПГ), представляющие собой инфицированные вирусом герпеса простого клетки Vero, содержащие не менее 80 % вирусосодержащих клеток (в рядах 1, 4, 7, 10 - антиген ВПГ первого типа, в рядах 2, 5, 8, 11 - антиген ВПГ второго типа), и контрольный антиген (кАг), представляющий собой незараженные клетки Vero (в рядах 3, 6, 9, 12).

2) **положительный контрольный образец (К+)** - сыворотка крови человека, содержащая антитела к вирусу герпеса простого.

3) **отрицательный контрольный образец (К-)** - сыворотка крови человека или сывороточный альбумин человека, не содержащие антител к вирусу герпеса простого:

а) К+, К- - аморфные порошки белого или светло-розового цвета;

б) опалесцирующие прозрачные жидкости: К+ - розового цвета, К- - синего цвета.

4) **конъюгат** - антитела диагностические против иммуноглобулинов человека, меченные пероксидазой хрена:

а) аморфный порошок белого или светло-желтого цвета, гигроскопичен;

б) прозрачная жидкость.

5) **буферная смесь с гидроперитом (БСГ)** для приготовления раствора хромогена:

а) порошок, таблетка, аморфная масса белого цвета или стекловидная, гигроскопичны;

б) прозрачная жидкость (концентрат или готовая к употреблению).

6) **хромоген (тетраметилбензидин-ТМБ):**

прозрачная жидкость.

7) **стабилизатор (СТ):**

а) сывороточный альбумин (бычий или лошадиный) или аналогичные импортные или отечественные препараты, сухой;

б) казеин - непрозрачная жидкость белого или желтоватого цвета.

8) **концентрат (25х) раствора №1** для отмывания планшетов и приготовления разведений сывороток и конъюгата (концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, ФСБ-Т)

прозрачная или опалесцирующая пенящаяся жидкость; при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при 35-37 °С в течение 30 минут.

Тест-система рассчитана на проведение 64 анализов, включая контрольные.

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система "БиоСкрин-ВПГ" предназначена для выявления антител к вирусу герпеса простого (ВПГ) 1 и 2 типов в сыворотке и плазме крови человека.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

ПРИНЦИП ТЕСТИРОВАНИЯ. На поверхности лунок планшета для иммунологических реакций адсорбированы антигены вируса герпеса простого 1 и 2 типов. При инкубации в лунках планшета исследуемых образцов сывороток антитела, специфичные к белкам вируса герпеса простого 1 и 2 типов, взаимодействуют с адсорбированными антигенами, образуя иммунные комплексы. После отмывки несвязавшихся антител в лунки добавляют конъюгат (антитела против иммуноглобулинов человека, меченные пероксидазой хрена), который взаимодействует с вирусспецифическим комплексом антиген-антитело. После отмывки связавшийся конъюгат выявляют с помощью раствора хромогена (тетраметилбензидина) в присутствии перекиси водорода, который приобретает окраску от светло-голубой до голубой. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антител к вирусу герпеса простого в образце. При отсутствии в исследуемом образце антител к вирусу герпеса простого иммунные комплексы не образуются и раствор хромогена не окрашивается. После остановки ферментативной реакции раствором серной кислоты с помощью спектрофотометра измеряют оптическое поглощение окрашенного раствора в лунках планшета при длине волны 450нм.

Перед проведением исследований необходимо внимательно изучить все разделы инструкции!

Для проведения анализа используйте сыворотку или плазму крови, взятой из вены или пальца в количестве не менее 1,5мл.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. При необходимости следует осветлять образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием. Образцы сыворотки следует хранить при 2-10 С не более 10 суток. При температуре минус 15 С и ниже сыворотки допускается хранить до одного года. При этом не рекомендуется многократное замораживание и оттаивание образцов.

ВНИМАНИЕ! Исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом может привести к получению ложных результатов.

Каждый образец сыворотки или буферного раствора необходимо отбирать новым наконечником.

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

Не следует проводить анализ образцов таким образом, чтобы на одного оператора одновременно приходилось более четырех планшетов.

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

- все отработанные растворы обрабатывать 4%-ным раствором хлорамина или 6%-ным раствором перекиси водорода при комнатной температуре в течение 3 ч;
- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой, а затем подвергать автоклавированию;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70% спиртом.
- для анализа дополнительно требуются следующие материалы и оборудование:
 - очищенная (дистиллированная или деионизованная) вода;
 - серная кислота квалификации "хч" или "осч";
 - глицерин;
 - хлорамин или перекись водорода для обеззараживания;
 - резиновые перчатки;
 - спирт этиловый;
 - пипетки одноканальные автоматические для подачи жидкостей в объеме от 10 до 1000 мкл;
 - пипетки 12-канальные (8-канальные) для подачи жидкости в объеме от 10 до 100 мкл;
 - наконечники полипропиленовые на 250 мкл;
 - наконечники полипропиленовые на 1000 мкл;
 - центрифуга настольная на 7-10 тыс. об/мин;
 - пробирки центрифужные полипропиленовые на 1,5-2,2 мл для хранения и осветления образцов сыворотки;
 - мерные стаканы или цилиндры на 25-50 и 500 мл;
 - ванночки для реагентов или стеклянные чашки Петри;
 - воздушный термостат на 37 С;
 - аппарат для промывания планшетов;
 - встряхиватель (вибратор) для планшетов (не обязательно);
 - спектрофотометр для измерения оптического поглощения на 450нм;
 - контейнер для сброса зараженных твердых отходов;
 - автоклав для инактивации зараженных отходов;
 - контейнер для слива зараженных жидкостей;
 - вата гигроскопическая;
 - фильтровальная бумага.

1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

(для постановки реакции на одном планшете)

Перед постановкой реакции все используемые растворы выдержите при комнатной температуре около 30 минут и тщательно взбалтывайте.

1.1. Раствор №1 - для отмывания планшетов.

При выпадении в концентрате кристаллов прогрейте его перед разведением при температуре 35-37 °С до полного растворения. Интенсивно взболтайте

содержимое флакона. Разведите 12 мл концентрата (25x) раствора №1 в 300 мл дистиллированной или деионизованной воды.

Хранить не более 3 суток при температуре 2-10 °С.

1.2. Раствор №2 - для приготовления разведений сывороток и конъюгата.

В 100 мл раствора №1 разведите содержимое ампулы (флакона) со стабилизатором, тщательно ополаскивая флакон или ампулу полученным раствором. Время растворения при перемешивании - не более 30 мин.

Хранить не более 24 ч при 2-10 °С.

1.3. Рабочий раствор хромогена (ТМБ).

Готовят перед использованием в защищенном от света месте.

Отберите 10 мл раствора БСГ (раствор №6), поместите в чистую емкость и добавьте 1 мл раствора ТМБ, тщательно перемешайте.

ВНИМАНИЕ! При манипуляциях с реагентами, содержащими ТМБ, необходимо избегать их попадания на незащищенную кожу и слизистые оболочки; в случае контакта - промывать большим количеством воды. Посуду и наконечники пипеток, контактировавшие с раствором хромогена, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, т.к. даже их следы приводят к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе пероксидазной реакции. Избегайте также контакта раствора хромогена с металлами.

Нельзя использовать раствор ТМБ, если он приобретает в процессе приготовления голубое окрашивание.

1.4. Раствор конъюгата.

Из пробирки с конъюгатом отберите 0,4мл, перенесите в чистую емкость и добавьте 12 мл раствора №2. Тщательно перемешайте.

Рабочий раствор конъюгата хранить не более 15 мин при 4-25 °С в защищенном от света месте.

1.5. Раствор серной кислоты (2,5 моль/л) для остановки пероксидазной реакции (в наборе не поставляется).

К 43 мл дистиллированной воды добавьте 7 мл концентрированной серной кислоты квалификации "хч" или "осч" и перемешайте (соблюдайте очередность смешивания компонентов).

Хранение не ограничено.

Для контроля пригодности серной кислоты к 1 мл раствора хромогена с БСГ добавьте 0,5 мл раствора серной кислоты в концентрации 2,5 моль/л и выдержите 15 мин в защищенном от света месте при комнатной температуре. Раствор должен оставаться прозрачным и бесцветным.

2. ПОДГОТОВКА СЫВОРОТОК

2.1. Подготовка контрольных образцов (К+, К-) (в наборе с жидкими контрольными образцами).

Из пробирки с каждым контрольным образцом отберите 0,05 мл, перенесите в чистую пробирку и добавьте 0,45 мл раствора №2 (рабочее разведение):

Перемешайте пипетированием. Последующее разведение не требуется.

Рабочее разведение сыворотки храните при 2-10 °С не более 24 часов.

2.2. Подготовка испытуемых сывороток.

Испытуемые сыворотки разведите 1:100 раствором №2 во вспомогательных пробирках или на пластиковых панелях с лунками вместимостью 2 мл.

Например, внесите во все вспомогательные пробирки/лунки по 1,0 мл раствора №2. Затем внесите по 10 мкл испытуемой цельной сыворотки, перемешивая пипетированием или с помощью вибратора.

Разведенные испытуемые сыворотки не храните!

3. ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

3.1. Планшеты освободите от упаковки и разместите на рабочем месте.

3.2. Порядок внесения исследуемых и контрольных образцов сывороток.

Каждый образец рабочего разведения сыворотки внесите в три параллельных ряда с антигеном ВГП первого типа (ряды 1, 4, 7) с антигеном ВГП второго типа (ряды 2, 5, 8) и с контрольным антигеном (ряды 3, 6, 9) (см.рис.1). Например, сыворотку №1 в лунки ряда А (1, 2, 3); сыворотку №2 в лунки ряда В (1, 2, 3) и т.д.

3.2.1. Внесение испытуемых образцов.

Перенесите по 100 мкл каждой испытуемой сыворотки в три параллельных ряда рабочего планшета. Оставьте незаполненными 18 лунок для контролей.

3.2.2. Внесение контрольных образцов.

В шесть лунок (четыре лунки С10, С11, D10, D11 с вирусными антигенами и две лунки С12, D12 с контрольным антигеном) внесите по 100 мкл рабочего разведения К+; в шесть лунок (четыре лунки E10, E11, F10, F11 с вирусными антигенами и две лунки E12, F12 с контрольным антигеном) внесите по 100 мкл рабочего разведения К- (п.2.1.). В оставшиеся шесть лунок лунок (G10, G11, G12, H10, H11, H12) вместо сывороток внесите по 100 мкл раствора №2 для контроля конъюгата.

Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным и быстрым перемешиванием раствора в лунке с помощью наконечника автоматической пипетки или с помощью встряхивателя (вибратора).

Планшет заклейте пленкой или закройте чистой крышкой и инкубируйте в течение 60 мин при 37 °С.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	№1	№1	№1									
В	№2	№2	№2									
С										К+	К+	К+
Д										К+	К+	К+
Е										К-	К-	К-
Ф										К-	К-	К-
Г										КК	КК	КК
Н										КК	КК	КК
	Аг ВГП-1	Аг ВГП-2	кАг	Аг ВГП-1	Аг ВГП-2	кАг	Аг ВГП-1	Аг ВГП-2	кАг	Аг ВГП-1	Аг ВГП-2	кАг

Рис. 1. Расположение лунок с сорбированными антигенами вируса герпеса простого первого типа (АгВПГ-1), вируса герпеса простого второго типа (АгВПГ-2) и контрольным антигеном (кАг) на рабочем планшете.

3.3 Удалите раствор сывороток из лунок с помощью промывателя, затем планшет 5-кратно раствором №1, внося в лунки не менее 0,2 мл раствора, выдерживая залитые планшеты не менее 15 секунд и полностью удаляя промывающий раствор. По окончании промывания тщательно удалите влагу из лунок, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

3.4. Во все лунки планшета внесите по 100 мкл раствора конъюгата (п.1.4.). Планшет закройте сухой крышкой или заклейте новым листом пленки и инкубируйте в течение 1 часа при 37 °С.

3.5. . Удалите раствор конъюгата из лунок с помощью промывателя, затем планшет 5-кратно промойте раствором №1, как описано в п.3.3, после чего тщательно удалите влагу.

3.6. В каждую лунку планшета внесите по 100 мкл раствора хромогена (субстратно-индикаторной смеси) (п.1.3.). Планшет накройте крышкой и поместите в защищенное от света место на 20 мин при температуре 15-25 °С.

Не располагайте планшеты стопкой!

3.7. Остановите пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл раствора серной кислоты в концентрации 2,5 моль/л (п.1.1.5.) и немедленно проведите учет результатов.

4. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ИФА

Измерение оптической плотности (ОП) проводите при длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществляйте только по воздуху.

4.1. Проверка правильности проведения опыта.

Результаты измерения оптической плотности (ОП) для контрольных образцов должны удовлетворять следующим требованиям:

среднее значение ОП(КК) по шести лункам (с АгВПГ-1, АгВПГ-2 и кАг) должно быть не выше 0,2;

при исследовании К+ для ВПГ-1 разность (ОПАгВПГ-1 - ОПкАг) должна быть не менее 0,8 ;

при исследовании К+ для ВПГ-2 разность (ОПАгВПГ-2 - ОПкАг) должна быть не менее 0,5 ;

при исследовании К- разность (ОПАгВПГ - ОПкАг) как для ВПГ-1, так и для ВПГ-2 должна быть менее 0,2.

В случае соблюдения всех этих условий можно приступить к учету результатов анализа исследуемых образцов. В противном случае реакцию необходимо переставить.

4.2. Учет результатов исследований.

Для каждой сыворотки вычислите разность (ОПАгВГП - ОПкАг) для ВГП-1 и ВГП-2.

Если разность (ОПАгВГП - ОПкАг) как для ВГП-1, так и для ВГП-2 больше или равна 0,20, то сыворотка расценивается как положительная, т.е. содержащая антитела к вирусу герпеса простого.

Если разность (ОПАгВГП - ОПкАг) как для ВГП-1, так и для ВГП-2 меньше 0,20, то сыворотка расценивается как отрицательная, т.е. не содержащая антител к вирусу герпеса простого.

Данный препарат предназначен только для установления иммунного статуса пациента в отношении вируса герпеса простого. Для проведения диагностики первичной герпетической инфекции сыворотку необходимо исследовать на содержание антител класса М, либо на содержание низкоавидных антител класса G к вирусу герпеса простого.

ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-система выпускается в виде следующего набора реагентов, упакованных в коробку:

Наименование компонентов	Количество
1. Иммуносорбент	2 шт.
2. К+ - по 0,2 мл (жидкая) во флаконе	1 шт.
3. К- - по 0,2 мл (жидкая) во флаконе	1 шт.
4. Конъюгат - 1,6 мл (жидкий) в пластиковой пробирке на 2 мл	2 шт.
5. Буферная смесь с гидроперитом (БСГ) - по 26 мл во флаконе	1 шт.
6. Хромоген (ТМБ) - по 2,5 мл во флаконе	1 шт.
7. СТ (БСА или казеин) - по 1 г или 5,0 мл во флаконе	1 шт.
8. Концентрат раствора №1 (ФСБ-Т) - по 26 мл во флаконе	2 шт.

Количество флаконов (ампул) с конъюгатом может быть увеличено в зависимости от его титра.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Наборы хранят и транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре 2-10°C, в условиях, исключающих замораживание и нагрев выше 25°C.

Срок годности - 12 месяцев со дня выпуска.