



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА
РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К
ВИРУСУ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО И
ВТОРОГО ТИПОВ
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

ИФА-Герпес 1/2-IgM

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
28.05.2009 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор предназначен для анализа сыворотки или плазмы крови человека на наличие антител класса IgM к вирусу простого герпеса первого и второго типов методом иммуноферментного анализа

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Общая характеристика

Вирус простого герпеса (Herpes Simplex Virus) относится к семейству Herpesviridae и является ДНК-содержащим вирусом размером 150-200 нм в диаметре. Выделены два серотипа вируса ВПГ1 и ВПГ2, имеющие общий группоспецифический нуклеокапсидный антиген и разные типоспецифические антигены, связанные с нуклеокапсидом и липопротеиновой оболочкой. ВПГ1 преимущественно поражает кожу лица, ротовую полость, роговицу глаза, ВПГ2 – генитальную область. У инфицированного человека вирус сохраняется на протяжении всей жизни. Большую часть времени вирус находится в латентной форме и не вызывает клинических проявлений заболевания. Активация вируса происходит при снижении иммунитета, перегреве и переохлаждении организма. Диагностическое значение при первичной инфекции ВПГ имеют специфические антитела класса IgM, которые появляются на 4-6 день заболевания и достигают максимума на 15-20 сутки. При рецидивирующем герпесе появление IgM в сыворотке крови больного происходит при обострении заболевания.

2.2. Состав набора:

№	Наименование компонента	Количество
1	Иммуносорбент	1 шт.
2	Конъюгат	1 микропробирка; 1,5 мл
3	(К)	1 микропробирка; 0,35 мл
4	(К*)	1 микропробирка; 0,2 мл
5	(КРП)	2 флакона, 25 мл
6	(РРС)	1 флакон, 15 мл
7	(ТМБ)	1 флакон, 8 мл
8	(СБР)	1 флакон, 8 мл
9	(РРК)	1 флакон, 15мл
10	Стоп-реагент	1 флакон, 15 мл
11	Клейкая пленка	3 шт.

Принцип анализа. При внесении в лунки исследуемой сыворотки все антитела класса IgM, присутствующие в образце, связываются с моноклональными антителами на твердой фазе, образуя комплексы. На следующем этапе IgM, специфические именно к вирусу простого герпеса первого и второго типов, выявляют при помощи антигенов вируса простого герпеса первого и второго типов в составе пероксидазного конъюгата.

После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют субстратный буфер (перекись водорода) и раствор ТМБ. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность смеси в лунках при длине волны 450/620 нм, которая пропорциональна концентрации специфических IgM антител к ВПГ 1/2 в образцах сывороток или плазмы крови.

Примечание: оптическую плотность можно измерять в обновленном режиме (450 нм) относительно пустой лунки (бланк). Необходимо предусмотреть пустую лунку при анализе.

2.3. Набор рассчитан на проведение 96 анализов (включая контроли).

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 Рекомбинантные антигены-полипептиды, синтезированные в бактериях E.coli и содержащиеся в наборе "ИФА- Герпес 1/2 - IgM" являются биологически безопасными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.5 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток (плазмы), содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток или плазмы хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20 °С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

Необходимо помнить, что образец с добавленным азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина или бактериальным проростом не пригоден для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- 5.1 Фотометр для измерения оптической плотности;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
 - пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,010 до 0,1 мл (от 10 до 1000 мкл);
 - пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,03 до 0,35 мл (от 30 до 350 мкл);
 - суховоздушный термостат на 37 °С;
 - мерный цилиндр вместимостью 10, 50 и 1000 мл;
 - стакан мерный вместимостью 3000 мл;
 - ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
 - флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
 - клейкая пленка или крышка;
 - бумага фильтровальная;
 - перчатки резиновые хирургические;
 - вода дистиллированная;
 - контейнер для сбора твердых отходов;
 - контейнер для слива жидких отходов.

6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

(из расчета на 96 лунок)

6.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при комнатной температуре (18-22) °С в течение 30 мин.. Неиспользованные компоненты следует хранить при (2-8) °С.

6.2 Приготовление раствора для промывания планшета
Если КРП содержит кристаллы, его необходимо перед использованием прогреть при температуре (35-37) °С до полного растворения кристаллов.

Содержимое флакона с КРП интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. Отобрать 48 мл концентрата в мерный стакан вместимостью 3000 мл, добавить 2160 мл дистиллированной

воды и перемешать раствор стеклянной палочкой в течении (40-60) с.

Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 10 суток.

6.3 Приготовление раствора конъюгата

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит!

В чистый флакон (с пробкой) вместимостью 20 мл внести 10 мл РРК, добавить 1 мл конъюгата. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

6.4 Приготовление ТМБ-субстратного раствора

ВНИМАНИЕ! ТМБ-субстратный раствор готовят непосредственно перед использованием!

В чистый флакон (с пробкой) вместимостью 20 мл внести 6 мл СБР, добавить 6 мл раствора ТМБ и интенсивно перемешать смесь в течение (5-10) с.

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием ТМБ-субстратный раствор должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с ТМБ-субстратным раствором, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники.

7 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматическое или полуавтоматическое устройство для промывания планшетов – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них; лунки должны заполняться до краев (0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- полностью удалить раствор из лунок.

- на поверхности рамки и стрипов после последней аспирации не должно быть остатков жидкости. Удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Перед началом работы планшет освободить от упаковочного пакета.

8.2 Приготовить раствор для промывания планшета (п.6.2) и раствор конъюгата (п.6.3).

8.3 Внесите в лунки по 90 мкл раствора для разведения сывороток

8.4 Внести в лунку А1 – 0,010 мл (10 мкл) (K⁺);

- в лунки В1 и С1 – по 0,010 мл (10 мкл) (K);

- в остальные лунки – по 0,010 мл (10 мкл) исследуемых сывороток.

При внесении контрольных и исследуемых сывороток необходимо осторожно пипетировать смесь в лунках.

8.5 Накрыть планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубировать при температуре (37±2) °С в течение 60 мин.

8.6 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки, затем все лунки промыть 4 раз раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п. 7).

8.7 Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора конъюгата .

8.8 Планшет заклеить новой пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при температуре 37±2 °С в течение 30 мин.

8.9 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки, затем все лунки промыть 6 раз раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п. 7).

8.10 Приготовить ТМБ-субстратный раствор (п. 6.4).

8.11 Внести в лунки планшета по 0,100 мл (100 мкл) раствора ТМБ-субстрата. Планшет заклеить новой пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при комнатной температуре (18-25) °С в защищенном от света месте в течение 30 мин.

8.12 Остановить реакцию путем внесения во все лунки планшета по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента (в той же последовательности внесения, что и ТМБ-субстратный раствор).

8.13 Не позже чем через 5 мин после остановки реакции, определить ОП в лунках в двухволновом режиме: при длине волны 450 нм относительно 620 нм.

Оптическую плотность можно измерять в одноволновом режиме (450 нм) относительно пустой лунки (бланк). Необходимо предусмотреть пустую лунку при анализе.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1 Результаты учитывают только при соблюдении следующих условий: Рассчитать значение ОП_{ср} (K)

ОП_{ср} (K⁻) не должно превышать 0,2 ОЕ;

ОП (K⁺) должно быть не ниже 0,6 ОЕ.

Если одно из двух значений ОП (K⁻) больше 0,2 ОЕ его отбрасывают.

9.2 При соблюдении выше перечисленных условий вычислить граничное значение ОП (ГЗ) по формуле (1):

$$ГЗ = ОП_{ср} (K^-) + 0,2 \quad (1),$$

где 0,2 – константная величина.

9.3 Определить “серую зону”. “Серая зона” - зона значений ОП, от ГЗ до значений ОП меньших ГЗ на 10%.

9.4 Результат анализа считается отрицательным, если значение ОП исследуемого образца меньше нижнего уровня ОП “серой зоны”.

Результат анализа считается положительным, если значение ОП исследуемого образца больше ГЗ.

Образцы со значением ОП в пределах “серой зоны” считаются неопределенными. В этом случае тест рекомендуется повторить в двух лунках. Если результат снова будет неопределенным, необходимо повторить исследование сыворотки крови больного через 10-14 дней. Если при повторном тестировании результат снова будет в данном интервале значений, он считается отрицательным.

Для постановки диагноза следует учитывать не только данные серологического теста, но и клиническую картину заболевания.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1 Набор транспортируется всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С.

10.2 Хранение набора должно производиться в чистом, сухом и темном помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Замораживать набор запрещается.

10.3 Срок годности набора – **1 год**.

Библиография

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г. О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ № 351 от 16.12.98 г. Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [3] ОСТ 42-21-2-85 Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения . Методы, средства и режимы