ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного
количественного и качественного определения
иммуноглобулинов класса G к цитомегаловирусу в сыворотке (плазме) крови
(ЦМВ-IgG-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ЦМВ-IgG-ИФА-БЕСТ предназначен для иммуноферментного количественного и качественного определения иммуноглобулинов класса G к цитомегаловирусу в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Выявление иммуноглобулинов класса G к ЦМВ может быть использовано для диагностики первичной и рецидивирующей цитомегаловирусной инфекции, а также для проведения сероэпидемиологических исследований.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного, 6 калибровочных, 1 контрольного образцов, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, во время первой инкубации происходит связывание IgG к ЦМВ с рекомбинантным антигеном, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена связывается с IgG к ЦМВ, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Далее, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации IgG к ЦМВ в анализируемых пробах.

После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация IgG к ЦМВ в анализируемых пробах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности рекомбинантным антигеном ЦМВ человека, готовый для использования – 1 шт;

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

– калибровочные образцы на основе инактивированной сыворотки крови, содержащие известные количества IgG к ЦМВ — 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 5 РЕ/мл, концентрации IgG к ЦМВ в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 1,5 мл);

– контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека с известным содержанием IgG к ЦМВ, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);

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

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

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

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

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

– стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

– пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;

– ванночками для реагента – 2 шт.;

– наконечниками для пипеток на 5-200 мкл – 16 шт.;

– трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

– планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG к ЦМВ в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ЦМВ-IgG - ИФА-БЕСТ не превышает 8%.

3.2. Линейность. Зависимость концентрации IgG к ЦМВ в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей IgG к ЦМВ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0,25-5 РЕ/мл и составляет 90-110%.

3.3. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации IgG к ЦМВ предписанной в пробе, полученной пу-

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

тём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 0,5 РЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.4. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация IgG к ЦМВ не превышает 0,1 РЕ/мл.

3.5. Специфическая активность:

чувствительность по иммуноглобулинам класса G к ЦМВ – соответствие результатов выявления набором иммуноглобулинов класса G к ЦМВ требованиям СПП 05-2-432 составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности в лунках с положительными сыворотками $B_{17-24} > B_{0,25}$;

специфичность по иммуноглобулинам класса G к ЦМВ – соответствие результатов выявления набором иммуноглобулинов класса G к ЦМВ требованиям СПП 05-2-432 составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательными сыворотками $B_{1-16} < B_{0,25}$.

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; соблюдать требования методических указаний МУ-287-113-00.

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 помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказыва-

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

ющие 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, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– 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 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 гемолизованную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 7 суток или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 6 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

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. Приготовление конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или 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.

7.5. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Раствор ТМБ плюс готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента поместить в защищенное от света место.

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

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

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ плюс.

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

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

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
1	2,0	До 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.6. 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 крови, тщательно перемешать. При разведении сыворотки (плазмы) 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.

7.7. Внесение калибровочных, контрольного образцов и исследуемых сывороток крови в предварительном разведении.

7.7.1. Внесение калибровочных и контрольного образцов.

Количественное определение IgG к ЦМВ:

Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл калибровочных образцов, содержащих известные количества IgG к ЦМВ — 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 5 РЕ/мл, и по 100 мкл контрольного образца.

Качественное определение IgG к ЦМВ:

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

Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл калибровочных образцов, содержащих известные количества IgG к ЦМВ — 0; 0,25 РЕ/мл, и по 100 мкл контрольного образца.

7.7.2. Внесение сывороток (плазмы) крови в предварительном разведении

Внести в остальные лунки по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл исследуемых образцов сывороток (плазмы) крови в предварительном разведении в дублях.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 5-7 мин.

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

7.9. По окончании инкубации снять липкую пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 400 мкл промывочного раствора (см п. 7.3), с последующим отсасыванием через 30 с. Процесс промывки повторить еще 4 раза. Общее количество отмывок равно 5. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевёрнутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.10. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

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

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

7.11. По окончании инкубации промыть планшет как описано в п. 7.9.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс.

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

Для внесения раствора тетраметилбензидина плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

7.13. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, 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

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

длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху).

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Количественное определение IgG к ЦМВ.

9.1.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные и контрольный образцы.

Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации IgG к ЦМВ в калибровочных образцах (РЕ/мл).

Определить содержание IgG к ЦМВ в контрольном образце по калибровочному графику.

Учёт результатов количественного определения проводить в том случае, если содержание IgG к ЦМВ в контрольном образце соответствует указанному диапазону концентраций на этикетке.

9.1.2. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих исследуемые образцы сывороток крови, и определить в них содержание IgG к ЦМВ по калибровочному графику.

9.1.3. Исследуемый образец сыворотки крови считать отрицательным, если концентрация IgG к ЦМВ в нем менее 0,25 РЕ/мл.

Исследуемый образец сыворотки крови считать положительным, если концентрация IgG к ЦМВ в нем более 0,25 РЕ/мл.

9.1.4. Если концентрация IgG к ЦМВ в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 5 РЕ/мл, образец следует дополнительно развести РПРС 10 раз: внести в лунки вспомогательного планшета по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл сыворотки крови в предварительном разведении (п. 7.6.), тщательно перемешать; повторить анализ и полученный результат умножить на 10.

9.2. Качественное определение IgG к ЦМВ.

9.2.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные образцы.

Учёт результатов качественного определения проводить в том случае, если:

$$ОП_0 < 0,2;$$

где: $ОП_0$ - среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с калиб-

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

ровочным образцом 0 РЕ/мл, ед.опт. плотн.

9.2.2. Исследуемый образец сыворотки крови считать отрицательным, если его оптическая плотность $ОП_{обр} < ОП_{0,25}$.

Исследуемый образец сыворотки крови считать положительным, если его оптическая плотность $ОП_{обр} > ОП_{0,25}$.

где: $ОП_{0,25}$ - среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с калибровочным образцом 0,25 РЕ/мл, ед.опт. плотн.

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. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

10.4. 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;

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

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор для разведения сывороток и стоп-реагент 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.

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

10.6. 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».

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

По вопросам, касающимся качества набора ЦМВ-IgG-ИФА-БЕСТ, следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская область, 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