

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного
выявления иммуноглобулинов класса М к цитомегаловирусу методом «захвата»
в сыворотке (плазме) крови
(ЦМВ-IgM – ИФА – БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к цитомегаловирусу методом «захвата» в сыворотке (плазме) крови «ЦМВ-IgM – ИФА – БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М (IgM) к цитомегаловирусу (ЦМВ) методом «захвата» в сыворотке (плазме) крови человека посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Для исследования небольшой партии проб возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения IgM к ЦМВ основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации происходит связывание IgM, содержащихся в исследуемых образцах, с иммобилизованными на поверхности лунок планшета моноклональными антителами к IgM человека.

Во время второй инкубации связавшиеся IgM к ЦМВ взаимодействуют с добавленным в лунки рекомбинантным антигеном ЦМВ, конъюгированным с пероксидазой хрена.

Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием раствора тетраметилбензидина плюс.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИСД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией герпес-вирусных инфекций М.П. Кандрушиной и с.н.с. лаборатории герпес-вирусных инфекций Е.Ю. Косовой.

Реакцию останавливают добавлением стоп-реактанта и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–655 нм, допускается измерение при длине волны 450 нм. Интенсивность жёлтого окрашивания пропорциональна концентрации IgM к ЦМВ в анализируемом образце.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к IgM человека, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), содержащий IgM к ЦМВ, инактивированный, готовый для использования – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец (K^-), не содержащий IgM к ЦМВ, инактивированный, готовый для использования – 1 фл., 3,0 мл;
- конъюгат рекомбинантного антигена ЦМВ с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 фл., 10 мл;
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 фл., 12 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 фл. по 28 мл;
- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реактент, готовый для использования – 1 фл., 12 мл;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов (12 восьмилуночных стрипов), готовый для использования – 1 шт.

Принадлежности:

- плёнки для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночки для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для дозаторов на 2-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления IgM к ЦМВ – соответствие результатов определения набором IgM к ЦМВ требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-296), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: значения оптической плотности в лунках с положительными образцами СПП больше или равно $OP_{\text{крит}}$.

3.2. Специфичность выявления IgM к ЦМВ – соответствие результатов определения набором IgM к ЦМВ требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-296), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: значения оптической плотности в лунках с отрицательными образцами СПП меньше $0,8 \times OP_{\text{крит}}$.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления иммуноглобулинов класса М к цитомегаловирусу: клинические испытания, проведенные на 156 положительных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 106 пациентов, показали 100 % чувствительность (интервал 97,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления иммуноглобулинов класса М к цитомегаловирусу: клинические испытания, проведенные на 212 отрицательных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 162 пациентов, показали 100 % специфичность (интервал 98,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

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 января 1991 г. и в методических указаниях МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, 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 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.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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 $(37 \pm 1)^\circ C$;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5-5000 мкл;
- дозаторы полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей 5-300 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 100 и 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия или ЭДТА.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20 °C (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.

6.4. Образцы сывороток 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 КОМПОНЕНТОВ 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 60 мин.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть заворачивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.2. Подготовка планшета с иммобилизованными моноклональными антителами к IgM человека.

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

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Для этого, в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов), внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 1 месяца или при температуре от 18 до 25 °С не более 7 суток.

7.4. Подготовка контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.5. Подготовка исследуемых образцов.

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток. Для этого внести в лунки планшета для предварительного разведения по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы), тщательно перемешать. При разведении сыворотки красный цвет должен измениться на жёлтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

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

7.6. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллиро- ванная 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

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Раствор ТМБ плюс готов к использованию.

Исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ плюс.

Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ плюс в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

Утилизировать раствор ТМБ плюс, оставшийся в ванночке или флаконе после проведения ИФА (не сливать во флакон с исходным раствором).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ плюс необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ плюс, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ плюс в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.8. Подготовка стоп-реагента.

Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внесение контрольных и исследуемых образцов.

В две лунки стрипа (п.7.2.), например, в А-1 и В-1, внести по 100 мкл K^- ; в одну лунку, например, С-1, 100 мкл K^+ . В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (см. п. 7.5), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

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

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

8.2. По окончании инкубации снять липкую плёнку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз 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 окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. Внести во все лунки планшета по 100 мкл конъюгата.

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

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

8.4. По окончании инкубации содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть, как описано в п. 8.2.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс.

Для внесения раствора ТМБ плюс использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

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

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

8.7. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 655 нм; или при длине волны 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОП_{ср} К⁻).

9.2. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности (ОП_{крит}) по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}} \text{ К}^{-} + 0,3.$$

9.3. Оценка результатов:

– среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,25 ед. опт. плотн.;

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее ОП_{крит} × 3.

9.4. Только при соблюдении положений п. 9.3 можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.5. Результат анализа положительный, если ОП_{обр} ≥ ОП_{крит}.

Результат анализа отрицательный, если ОП_{обр} < 0,8 × ОП_{крит},

где ОП_{обр} – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом.

Результат анализа неопределённый, если ОП_{обр} попадает в интервал $0,8 \times \text{ОП}_{\text{крит}} \leq \text{ОП}_{\text{обр}} < \text{ОП}_{\text{крит}}$. В случае неопределённого результата рекомендуется повторно исследовать эти образцы параллельно с образцами данных больных, взятыми через 7–14 дней. Если результат остается неопределённым после повторного исследования, использовать другие методы для подтверждения диагноза острой цитомегаловирусной инфекции, например, выявление антигена или ДНК ЦМВ.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида,

при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С, в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

- неиспользованные стрипы планшета разборного с иммобилизованными моноклональными антителами к IgM человека хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;

- контрольные образцы, конъюгат, раствор для разведения сывороток, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор ТМБ плюс, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;

- неиспользованные стрипы планшета для предварительного разведения исследуемых образцов хранить в закрытом пакете при температуре от 2 до 30 °С в течение всего срока годности набора;

- промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 месяца или при температуре от 18 до 25 °С не более 7 суток.

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, раствор ТМБ плюс), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

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

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, рабочий поселок Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, (383) 227-75-43.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru.

Старший научный сотрудник лаборатории
герпес-вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

Е.Ю. Косова

Зав. лабораторией
герпес-вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

М.П. Кандрушина

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

«Согласовано»

Зам. директора по научной работе ГБУЗ МО
«Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского»
д.м.н., профессор



А.В. Молочков

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 70 листов.
Руководитель лабораторного отдела ГБУЗ МО
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

“07” 10 2017 г. Кудрявцева Е.Н.



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 70 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"



Масяго А.В.
201 7 г.