



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор



«Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2014 г.

М.П.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного определения индекса авидности иммуноглобулинов
класса G к цитомегаловирусу в сыворотке (плазме) крови
(ВектоЦМВ – IgG – авидность)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВектоЦМВ – IgG – авидность» (далее по тексту – набор) предназначен для определения индекса авидности иммуноглобулинов класса G к цитомегаловирусу (ЦМВ) в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Определение индекса авидности иммуноглобулинов класса G к цитомегаловирусу позволяет уточнить сроки инфицирования, подтвердить диагноз первичной цитомегаловирусной инфекции и дифференцировать первичную и паст-инфекции.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 48 исследуемых образцов, включая контроли. Дробное использование набора позволяет проведение 6 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Специфическим реагентом набора является очищенный рекомбинантный антиген цитомегаловируса, иммобилизованный на поверхности лунок полистиролового разборного планшета.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в дублях в лунках стрипов с иммобилизованным антигеном. Антитела к ЦМВ связываются с иммобилизованным антигеном, формируя комплекс «антиген-антитело».

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором НИИСД М.Ю. Рукавишниковым и с.н.с. Е.Ю. Косовой



На второй стадии, после внесения белок-диссоциирующего агента в один из параллельных рядов, происходит диссоциация комплексов «антиген–антитело», включающих IgG с более низкими константами связывания (низкой avidностью).

На третьей стадии связавшиеся антитела взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител против IgG человека с пероксидазой хрена. Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к ЦМВ в анализируемом образце.

Индекс avidности рассчитывается как отношение оптической плотности, полученной в лунках в присутствии диссоциирующего агента, к оптической плотности, полученной при анализе без диссоциирующего агента и выражается в процентах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок рекомбинантным белком ЦМВ, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец ($K^+_{\text{ВА}}$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий высокоавидные IgG к ЦМВ, готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);
- положительный контрольный образец ($K^+_{\text{НА}}$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий низкоавидные IgG к ЦМВ; готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к ЦМВ, готовый для использования – 1 флакон (3,0 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Тх25) – 2 флакона (по 28 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12 мл);
- раствор сравнения (РС) – 1 флакон (8,0 мл);
- раствор белок-диссоциирующего агента (БДА) – 1 флакон (8,0 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 3 шт.;

- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 5-200 мкл – 16 шт.
- планшетом для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления низкоавидных IgG к ЦМВ по сывороткам стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-221), содержащим низкоавидные IgG, % – 100.

3.2. Специфичность выявления высокоавидных IgG к ЦМВ по сывороткам стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-221), содержащим высокоавидные IgG, % – 100.

3.3. Диагностическая специфичность выявления высокоавидных иммуноглобулинов класса G к цитомегаловирусу: клинические исследования, проведенные на 36 высокоавидных образцах, показали 100% специфичность (интервал 92%-100%, с достоверной вероятностью 90%).

3.4. Диагностическая специфичность выявления низкоавидных иммуноглобулинов класса G к цитомегаловирусу: клинические исследования, проведенные на 39 низкоавидных образцах, показали 100% специфичность (интервал 93%-100%, с достоверной 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 пораженный 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 клиничко-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 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 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. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– 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;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5-5000мкл
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей 5-300мкл
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

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

6.3. 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. ПРОВЕДЕНИЕ 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.

7.2. Подготовка планшета.

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 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.

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

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

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.4. Подготовка контрольных образцов.

Контрольные образцы ($K^+_{\text{ВА}}$, $K^+_{\text{НА}}$, K^-) готовы к использованию.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.5. Подготовка 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 (плазмы) крови, тщательно перемешать. При разведении сыворотки 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.

Предварительно разведенные исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови хранить не более 3 ч при температуре от 18 до 25 °С.

7.6. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор конъюгата утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Конъюгат после первого вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

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

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в ванночку для реагента и поместить в защищенное от света место.

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

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

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

7.8. Стоп-реагент готов к использованию. Стоп-реагент после первого вскрытия хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Таблица

Количество используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор (однократный ФСБ-Т)	
			ФСБ-Т, концентрат, мл	Вода дистиллированная, мл
2	2,0	2,0	4,0	до 100
4	4,0	4,0	8,0	до 200
6	6,0	6,0	12,0	до 300
8	8,0	8,0	16,0	до 400
10	10,0	10,0	20,0	до 500
12	12,0	12,0	24,0	до 600

7.9. Внесение контрольных образцов и исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови в предварительном разведении.

В лунки стрипов внести попарно по 100 мкл контрольных образцов для прямого (нечетные стрипы) и диссоциирующего (четные стрипы) ИФА. Например, в лунки А-1, А-2 и В-1, В-2 – К⁻, в лунки С-1, С-2 – К⁺_{НА}, в лунки и D-1, D-2 – К⁺_{ВА}. В остальные лунки внести по 90 мкл раствора

для разведения сывороток, затем попарно в соседние лунки двух стрипов внести по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов, тщательно перемешать (см. схему).

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

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

Схема

	1	2	3	4	5	6
A	K ⁻	K ⁻	сыв. 5	сыв. 5	сыв.13	сыв.13
B	K ⁻	K ⁻	сыв.6	сыв.6	сыв.14	сыв.14
C	K ⁺ _{HA}	K ⁺ _{HA}	сыв.7	сыв.7	сыв.15	сыв.15
D	K ⁺ _{BA}	K ⁺ _{BA}	сыв. 8	сыв. 8	сыв.16	сыв.16
E	сыв. 1	сыв. 1	сыв.9	сыв.9	сыв.17	сыв.17
F	сыв.2	сыв.2	сыв. 10	сыв. 10	сыв.18	сыв.18
G	сыв.3	сыв.3	сыв.11	сыв.11	сыв.19	сыв.19
H	сыв. 4	сыв. 4	сыв. 12	сыв. 12	сыв.20	сыв.20
	PC	БДА	PC	БДА	PC	БДА

7.10. 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). Процесс промывки повторить еще 1 раз. Общее количество отмывок равно 2. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.11. Во все лунки для прямого ИФА внести по 100 мкл раствора сравнения. Во все лунки для диссоциирующего ИФА внести по 100 мкл белок-диссоциирующего агента.

Заклеить планшет пленкой и инкубировать в течение 15 мин при температуре от 18 до 25 °C.

7.12. По окончании инкубации содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 3 раза промывочным раствором, как описано в п. 7.10.

7.13. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата (см п. 7.6.). Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 ± 1 °C.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

7.14. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим

раствором, лунки промыть 5 раз, так как описано в п. 7.10.

7.15. Во все лунки внести по 100 мкл раствора ТМБ.

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

Для внесения раствора ТМБ использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

7.16. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм, при этом выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом в прямом ИФА ($ОП_{срК^- \text{ прям ИФА}}$).

9.1.1. Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) в прямом ИФА:

$$ОП_{крит} = ОП_{срК^- \text{ прям ИФА}} + 0,15 \quad (1)$$

9.1.2. Вычислить индексы авидности $K_{ВА}^+$ и $K_{НА}^+$ по формуле:

$$ИА = \frac{ОП_{дисс \text{ ИФА}}}{ОП_{\text{прям ИФА}}} \times 100\%, \text{ где} \quad (2)$$

$ОП_{дисс \text{ ИФА}}$ – оптическая плотность в лунках с белок-диссоциирующим агентом (БДА);

$ОП_{\text{прям ИФА}}$ – оптическая плотность в лунках с раствором сравнения (РС).

9.2. Среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,25 ($ОП_{срК^- \text{ (прямой ИФА)}} \leq 0,25 \text{ о.е.}$).

Значение индекса авидности $K_{ВА}^+$ должно быть не менее 60% ($ИА K_{ВА}^+ \geq 60\%$);

Значение индекса авидности $K_{НА}^+$ должно быть не более 30% ($ИА K_{НА}^+ \leq 30\%$).

Только в случае соблюдения указанных условий можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.3. На основании полученных данных для исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови с $ОП_{\text{прям.ИФА}} \geq ОП_{крит}$, вычислить индекс авидности по формуле 2 (см п. 9.1.2.).

9.4. Значение $ИА < 30\%$ указывает на наличие низкоавидных антител;

значение $ИА > 50\%$ указывает на наличие высокоавидных антител;

значение $ИА$ в интервале 30-50 % – пограничный результат.

Для образцов с ОП близкой к $ОП_{крит}$ (в пределах от $ОП_{крит}$ до $2 \times ОП_{крит}$) ошибка в

определении индекса avidности может быть достаточно велика. Сыворотки от таких пациентов необходимо исследовать в динамике.

Если ОП исследуемой сыворотки выше 3 о.е., возможна ошибка в определении ИА. С целью правильного определения индекса avidности специфических иммуноглобулинов в таких сыворотках (особенно при наличии в сыворотке специфических IgM) измерить величину оптической плотности в лунках стрипов на длине волны 405 нм (референс-волна остается неизменной – 620–655 нм). Такой порядок учета результатов позволит не пропустить слабopоложительные сыворотки (регистрация ОП на 450 нм), а индекс avidности сильноположительных сывороток можно будет рассчитать по оптической плотности, измеренной на длине волны 405 нм.

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. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

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

- неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор сравнения, раствор белок-диссоциирующего агента и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- контрольные образцы, конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

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

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), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

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 «ВектоЦМВ-IgG-авидность», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 363-20-60, 227-75-43, тел./факс (383) 363-13-46, 363-35-55.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Старший научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

Е.Ю. Косова

Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

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



А.В. Молочков

Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"

А.В. Масяго

"20" ВЕКТОР 10 2020

