

«УТВЕРЖДЕНА»
Приказом Росздравнадзора



Генеральный директор
«Биосервис»
Оксанич А.С.

от _____ 201_ г. № _____

«16» декабря 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления антител к основному предраннему белку цитомегаловируса
«БиоСет-актив-ЦМВ»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «БиоСет-актив-ЦМВ» предназначен для выявления антител к основному предраннему белку ЦМВ в активной стадии инфекции в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

На поверхности лунок разборных полистироловых планшетов иммобилизованы рекомбинантный полипептид – аналог основного предраннего белка цитомегаловируса («AgЦМВ») и β -галактозидаза *E. coli* в качестве контрольного антигена («K_{Ag}»).

Положительный контрольный образец инактивированный K⁺ представляет собой сыворотку крови человека, содержащую антитела IgG к основному предраннему белку цитомегаловируса и не содержащую антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена p24 ВИЧ-1 и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от +54 до +56 °C в течение 3 ч.

Отрицательный контрольный образец инактивированный K⁻ представляет собой сыворотку крови человека, не содержащую антител IgG к основному предраннему белку цитомегаловируса, не содержащую антител к белкам возбудителя сифилиса *Treponema pallidum*, к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена p24 ВИЧ-1 и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от +54 до +56 °C в течение 3 ч.

Конъюгат представляет собой моноклональные антитела мыши против IgG человека, связанные с ферментом пероксидазой хрена. Поставляется в виде концентрата.

Раствор № 4 для разведения хромогена содержит субстрат ферментативной реакции.

Хромогеном является 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

Стоп-реагент представляет собой 1 М раствор серной кислоты.

Исследуемые сыворотки тестируются одновременно в двух параллельных лунках, в которых раздельно иммобилизованы рекомбинантный белок ЦМВ и контрольный антиген. При инкубации образцов сыворотки в лунках планшета специфические к основному предраннему белку цитомегаловируса антитела связываются с рекомбинантным антигеном на твердой фазе, образуя иммунные комплексы антиген-антитело, и не взаимодействуют с контрольным антигеном, иммобилизованным в параллельной лунке. После удаления несвязавшихся антител в лунки добавляют конъюгат - мышинные моноклональные антитела к Fc-фрагменту IgG человека, меченные пероксидазой хрена, - который взаимодействует с комплексом антиген-антитело. После удаления несвязавшегося конъюгата в лунки планшета добавляют индикаторный раствор, включающий субстрат и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Ферментативная реакция пероксидазы с хромогеном приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации антител к основному предраннему белку ЦМВ в исследуемом образце. После остановки реакции стоп-реагентом интенсивность окрашивания раствора измеряют на спектрофотометре по оптическому поглощению при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм).

2.2. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят следующие компоненты, упакованные в коробку:

Компонент	Описание	Количество
Иммуносорбент	Разборный 96-луночный планшет для иммунологических реакций с прозрачным плоским дном лунок.	1 шт.
Положительный контрольный образец инактивированный К	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость розового цвета.	0,2 мл 1 пробирка
Отрицательный контрольный образец инактивированный К	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета.	0,2 мл 1 пробирка
Конъюгат	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	от 0,5 до 1,5 мл 1 пробирка
Концентрат раствора № 1 для промывания планшетов (×25)	Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре от +35 °С до +37 °С в течение 30 минут.	25 мл 1 флакон
Раствор № 2 для разведения сывороток	Пенящаяся опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	13 мл 1 флакон
Раствор № 3 для разведения конъюгата	Прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	13 мл 1 флакон

Раствор № 4 для разведения хромогена	Прозрачная бесцветная жидкость.	13 мл 1 флакон
Хромоген	Прозрачная бесцветная жидкость.	1,3 мл 1 пробирка
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость.	8 мл 1 флакон

По запросу клиента набор дополнительно укомплектовывается 1 флаконом концентрата раствора № 1 для проведения анализа на автоматическом ИФА-анализаторе.

Один набор рассчитан на проведение 48 анализов сыворотки (плазмы), включая контрольные.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

Чувствительность набора составляет 100 % для положительных сывороток стандартной панели предприятия СПП «БиоСет-актив-ЦМВ», содержащих и не содержащих антитела IgG к основному предраннему белку цитомегаловируса. Максимальное разведение стандартного образца предприятия СОП К¹, при котором регистрируется положительный результат анализа, составляет не менее 1:40.

Специфичность набора составляет 100 % для отрицательных сывороток стандартной панели предприятия СПП «БиоСет-актив-ЦМВ», содержащих и не содержащих антитела IgG к основному предраннему белку цитомегаловируса. Среднее значение оптической плотности при 450 нм для стандартного образца предприятия СОП К² по трем лункам с AgЦМВ не превышает 0,20 о.е.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

- не пипетировать растворы ртом, при работе использовать индивидуальные средства защиты (резиновые перчатки и защитные очки);
- все отработанные растворы и отходы после завершения анализа обрабатывать в соответствии с установленными нормами безопасности (например, в течение 16-18 часов в растворе гипохлорита натрия в конечной концентрации 1 %);
- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергать автоклавированию в течение 60 мин при +121 °С или сжигать;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-м раствором этилового спирта;
- утилизировать отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- дистиллированная или деионизованная вода;
- дезинфицирующие растворы, соответствующие санитарным требованиям;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;
- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 мл до 5,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- пипетки 8- или 12-канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 мкл до 100 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- центрифуга настольная на (3-10) тыс. об/мин для получения и осветления образцов сыворотки/плазмы крови в микропробах;
- микропробирки полипропиленовые чистые или планшеты для микротитрования (не использованные ранее!) для предварительного отбора испытуемых образцов;
- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью (1,5-2,2) мл для хранения и осветления образцов сыворотки/плазмы;
- мерный стакан или цилиндр вместимостью (250-500) мл;
- мерная посуда вместимостью до 25 мл;
- ванночки для реагентов или стеклянные чашки Петри;
- воздушный термостат на +37 °С;
- крышки для планшетов или липкая пленка для закрывания планшетов при инкубации;
- аппарат для промывания планшетов;
- спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм);
- контейнер для сброса твердых отходов;
- контейнер для слива использованных жидкостей;
- контейнер для инактивации отходов;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага;
- пленка полиэтиленовая.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для проведения анализа используются образцы сыворотки или плазмы крови человека в объеме 50 мкл.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Следует осветлять образцы, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием (10 ± 1) мин при (2500-3000) об/мин. Собранные образцы сыворотки/плазмы хранить при температуре от +4 °С до +6 °С. Если образцы невозможно протестировать в течение 72 ч, то их следует хранить при температуре не выше -15 °С. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, может привести к получению ложных результатов.

6.1. С целью одновременного внесения испытуемых образцов в рабочий планшет с иммуносорбентом следует предварительно внести по 50 мкл образцов сывороток в лунки дополнительного планшета, не содержащего иммуносорбента.

Каждый исследуемый образец или буферный раствор необходимо отбирать новым пипеточником.

ВНИМАНИЕ!

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

При инкубациях не располагать планшеты стопкой!

Анализ проб следует проводить так, чтобы в случае отсутствия автоматического анализатора на одного оператора одновременно приходилось не более четырех планшетов.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ.

Условия и сроки хранения компонентов набора после вскрытия индивидуальной упаковки приведены в таблице № 1:

Таблица № 1.

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	от +2 °С до +8 °С в плотно закрытом пакете	8 недель

K ⁺ , K ⁻ , конъюгат, концентрат раствора № 1, растворы № 2, № 3, № 4, хромоген	от +2 °С до +8 °С	8 недель
Стоп-реагент	от +2 °С до +8 °С	до окончания срока годности набора

Перед началом работы набор необходимо выдержать при комнатной температуре 30 минут.

Растворы № 2, № 3, K⁺, K⁻, стоп-реагент поставляются в готовом виде. Перед использованием флаконы с растворами № 2 и № 3, пробирки с контрольными образцами, K⁺, K⁻ интенсивно встряхнуть.

7.1. Приготовление рабочего раствора № 1 для промывания планшетов.

Содержимое флакона перемешать. При выпадении в концентрате кристаллов его следует прогреть перед разведением при температуре от +35 до +37 °С до полного растворения.

7.1.1. Для приготовления рабочего раствора № 1 при использовании цельного планшета отобрать 12 мл концентрата (× 25) раствора № 1 в чистую емкость и довести объем деионизированной водой до 300 мл. Тщательно перемешать.

7.1.2. Для приготовления рабочего раствора № 1 в расчете на модуль из 3-х стрипов планшета (24 лунки) отобрать 6 мл концентрата (× 25) раствора № 1 в чистую емкость и довести объем деионизированной водой до 150 мл. Тщательно перемешать.

Готовый раствор хранить не более 24 ч при температуре от +4 °С до +12 °С или 4 часа при температуре от +18 °С до +24 °С.

7.2. Приготовление рабочего разведения конъюгата.

7.2.1. Для приготовления рабочего разведения конъюгата при использовании цельного планшета из пробирки с концентратом конъюгата отобрать _____ * мкл в чистую емкость и добавить 12 мл раствора № 3.

7.2.2. Для приготовления рабочего разведения конъюгата из расчета на модуль из трех стрипов из пробирки с концентратом конъюгата отобрать _____ * мкл в чистую емкость и добавить 3 мл раствора № 3.

Тщательно перемешать, не допуская образования пены.

Готовый раствор конъюгата хранить не более 15 мин при температуре от +9 °С до +25 °С в защищенном от света месте.

7.3. Приготовление индикаторного раствора.

* Объем отбираемого раствора индивидуален для каждой серии набора и указан в Инструкции, вкладываемой в наборы соответствующей серии.

7.3.1. Для приготовления индикаторного раствора при использовании цельного планшета отобрать 10 мл раствора № 4 в чистую посуду и добавить 1 мл хромогена.

7.3.2. Для приготовления индикаторного раствора из расчёта на модуль из трех стрипов планшета отобрать 3,0 мл раствора № 4 в чистую посуду и добавить 0,3 мл хромогена.

Тщательно перемешать.

Готовить непосредственно перед использованием в защищенном от света месте, избегая контакта с металлами и ионами металлов.

Готовый раствор хранению не подлежит.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором хромогена, буферной смесью с гидроперитом и индикаторным раствором, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе пероксидазной реакции. Избегать также контакта раствора хромогена с металлом.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Освободить планшет из упаковки и оставить в каретке необходимое количество стрипов. Остальные стрипы поместить обратно в пакет и хранить в соответствии с условиями, указанными в таблице № 1.

8.1. Рабочий планшет с иммобилизованными антигенами (иммуносорбент) перед использованием однократно промыть рабочим раствором № 1 автоматическим или ручным промывателем, полностью заполняя лунку раствором (по 250 мкл) и выдерживая его в лунках не менее 20 секунд. По окончании промывки тщательно удалить влагу из планшета, постукивая планшетою по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

8.2. Во все лунки планшета внести по 90 мкл раствора № 2.

8.2.1. В случае использования цельного планшета.

По 10 мкл каждой испытуемой сыворотки внести в две лунки вертикального ряда, как показано на рис. 1. В лунки G10, H10 внести по 10 мкл контрольной сыворотки K^+ , в лунки G11, H11 внести по 10 мкл K^- , в лунки G12, H12 сывороток не вносить (контроль конъюгата).

Рис. 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10	№11	№12	A, ЦМВ

В	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10	№11	№12	КАГ
С	№13	№14	№15	№16	№17	№18	№19	№20	№21	№22	№23	№24	АГ-ИМВ
Д	№13	№14	№15	№16	№17	№18	№19	№20	№21	№22	№23	№24	КАГ
Е	№25	№26	№27	№28	№29	№30	№31	№32	№33	№34	№35	№36	АГ-ИМВ
Ф	№25	№26	№27	№28	№29	№30	№31	№32	№33	№34	№35	№36	КАГ
Г	№37	№38	№39	№40	№41	№42	№43	№44	№45	К ⁺	К ⁻	КК	АГ-ИМВ
Н	№37	№38	№39	№40	№41	№42	№43	№44	№45	К ⁺	К ⁻	КК	КАГ

8.2.2. В случае использования отдельных модулей из трех стрипов планшета.

По 10 мкл каждой испытуемой сыворотки внести в две лунки вертикального ряда, как показано на рис. 2. В лунки G1, H1 внести по 10 мкл контрольной сыворотки К⁺; в лунки G2, H2 внести по 10 мкл К⁻; в лунки G3, H3 сывороток не вносить (контроль конъюгата).

Перемешать содержимое лунок пипетированием или на встряхивателе.

Рис. 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
А	№1	№2	№3	№10	№11	№12	№19	№20	№21	№28	№29	№30	АГ-ИМВ
В	№1	№2	№3	№10	№11	№12	№19	№20	№21	№28	№29	№30	КАГ
С	№4	№5	№6	№13	№14	№15	№22	№23	№24	№31	№32	№33	АГ-ИМВ
Д	№4	№5	№6	№13	№14	№15	№22	№23	№24	№31	№32	№33	КАГ
Е	№7	№8	№9	№16	№17	№18	№25	№26	№27	№34	№35	№36	АГ-ИМВ
Ф	№7	№8	№9	№16	№17	№18	№25	№26	№27	№34	№35	№36	КАГ
Г	К ⁺	К ⁻	КК	К ⁺	К ⁻	КК	К ⁺	К ⁻	КК	К ⁺	К ⁻	КК	АГ-ИМВ
Н	К ⁺	К ⁻	КК	К ⁺	К ⁻	КК	К ⁺	К ⁻	КК	К ⁺	К ⁻	КК	КАГ

Планшет накрыть чистой сухой крышкой или заклеить пленкой и выдержать в течение 30 минут при температуре (+37±1) °С.

Полезно поместить каждый планшет в полиэтиленовый пакет. Это обеспечит одинаковую влажность и позволит избежать краевых эффектов.

8.3. Промывание.

Удалить жидкость из лунок с помощью промывателя. Промыть лунки планшета 5-кратно рабочим раствором № 1 (см. п. 7.1.), внося в лунки по 250 мкл раствора и выдерживая его в лунках не менее 20 секунд. После промывания тщательно удалить влагу из планшета, как описано в п. 8.1.

ВНИМАНИЕ! Недостаточное промывание планшетов может привести к получению ложных результатов.

8.4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (п. 7.2.). Планшет закрыть сухой крышечкой или заклеить новым листом пленки и выдержать в течение 30 мин при температуре $(+37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

8.5. Промывание. Повторите процедуры, описанные в п. 8.1.

8.6. В каждую лунку планшета внести по 100 мкл индикаторного раствора (п. 7.3.). Планшет поместить в защищенное от света место на 15 мин при температуре от $+15 ^\circ\text{C}$ до $+25 ^\circ\text{C}$.

8.7. Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и немедленно провести учет результатов.

9. РЕГИСТРАЦИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение оптической плотности (ОП) проводить при длине волны 450 нм. Рекомендуемая длина волны сравнения (620-650) нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9.1. Учет результатов исследования проводить при соблюдении следующих условий:

ОП _{СР} К ⁺ по K _{AG}	не более 0,30
ОП _{СР} К ⁺ по AgЦМВ	не менее 0,80
ОП _{СР} К ⁻ по AgЦМВ	не более 0,30
ОП _{СР} К ⁻ по K _{AG}	не более 0,30
ОП _{СР} КК по двум лункам	не более 0,15

При получении иных показателей исследование повторить.

9.2. Для каждого исследуемого образца определить «величину превышения» (А) – разницу между ОП по AgЦМВ и ОП по K_{AG}:

$$A = \text{ОП AgЦМВ} - \text{ОП K}_{\text{AG}}$$

Результат исследования считается **положительным**, если «величина превышения» для