

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель генерального директора
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические системы»

О. Н. Шлюндин

2014 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-G-АВИДНОСТЬ»

Тест-система иммуноферментная
для определения индекса авидности антител класса G к цитомегаловирусу,
набор диагностический



Содержание

I. НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
II. ПРИНЦИП ТЕСТА	3
III. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-G-АВИДНОСТЬ»	3
IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	4
V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	4
VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ.....	5
VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ	5
VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ	5
IX. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	6
X. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ	6
XI. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ	7
XII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ.....	7
Приложение.....	8

Набор реагентов выпускается в одном комплекте:

Набор рассчитан на проведение 48 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного использования набора.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-G-АВИДНОСТЬ» – тест-система иммуноферментная для определения индекса авидности антител класса G к цитомегаловирусу в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с целью специфической диагностики первичной инфекции.

Внимание! Расчет индекса авидности возможен лишь для сывороток, предварительно исследованных с помощью тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-G-АВИДНОСТЬ» и показавших положительный результат на наличие АНТИ-ЦМВ-G-АВИДНОСТЬ-IgG.

II. ПРИНЦИП ТЕСТА

При постановке ИФА в тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-G-АВИДНОСТЬ» исследуемые образцы сывороток крови (предварительно разведенные РРС в 10 раз) вносят в лунки стрипов иммуносорбента с иммобилизованным рекомбинантным антигеном ЦМВ. При наличии в сыворотках специфических антител класса G к ЦМВ, образуется иммунный комплекс антиген-антитело (стадия 1).

После промывания планшета в часть лунок добавляют раствор сравнения. В другую часть лунок вносят раствор денатурирующий, который способствует разрыву связей антигенов и «ранних» IgG с низкой авидностью, которые удаляются при последующей промывке (стадия 2).

После внесения конъюгата контролируют его связывание с комплексом антиген-антитело с помощью раствора хромогена. Визуализация происходит в химической реакции пероксидазы с ТМБ-субстратным раствором с образованием цветной реакции, интенсивность желтого окрашивания пропорциональна концентрации IgG к ЦМВ в анализируемом образце. Присутствие в исследуемом образце вирусоспецифических IgG антител с низкой авидностью определяется более слабой интенсивностью окрашивания в лунках, обработанных РД (раствором денатурирующим), по сравнению с лунками обработанными раствором сравнения.

Индекс авидности рассчитывается, как соотношение оптической плотности, полученной в лунках с денатурирующим раствором (РД), к оптической плотности, полученной в лунках с раствором сравнения (РС) и выражается в процентах.

III. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-G-АВИДНОСТЬ»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент – планшет полистироловый 96-луночный разборный до стрипов (или до лунок), в лунках которого сорбирована смесь рекомбинантных антигенов ЦМВ.	1 планшет
Конъюгат - антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая желтого цвета жидкость.	1 флакон 11,0 мл
K₁+ (контрольный высокоавидный положительный образец) – инактивированный. Прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
K₂+ (контрольный низкоавидный положительный образец) – инактивированный. Прозрачная или слегка опалесцирующая оранжевого цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
K- (контрольный отрицательный образец) – инактивированный. Прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 2,5 мл
БР – блок-раствор для разведения исследуемых сывороток. Прозрачная или слегка опалесцирующая бледно-розового цвета жидкость.	1 флакон 11,0 мл
РРС – раствор для предварительного разведения исследуемых сывороток. Прозрачная или слегка опалесцирующая фиолетово-синего цвета жидкость.	1 флакон 11,0 мл
РД – раствор денатурирующий. Прозрачная сиреневого цвета жидкость.	1 флакон 6,0 мл
РС – раствор сравнения. Прозрачная зелено-голубого цвета жидкость.	1 флакон 6,0 мл
ПР (промывочный раствор) – концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т). Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °C и встряхивании.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор – прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 12,0 мл
Стоп-реагент – раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами. Имеется цветовая кодировка реагентов, а также маркировка посредством штрих-кодов. Реагенты помещают в коробку картонную, куда вкладывают инструкцию по применению.

Допускается изменение базовой комплектации набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объем), при этом количество каждого реагента набора должно быть достаточным для проведения ИФА.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетами или защитная пленка для ИФА планшетов	1 шт 2 шт
	Одноразовые наконечники	16 шт
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт
	Пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или пакет полиэтиленовый с замком Zip-Lock	1 шт
	Планшет для предварительного разведения сывороток	1 шт

IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность при проверке сывороток стандартной панели предприятия (РПП), содержащих низкоавидные и высокоавидные ЦМВ-G, составляет 100%.

V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ Министерства здравоохранения РФ № 4Н от 06 июня 2012 г.).

5.2. Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой (18 - 25) °С. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:
 - неспецифического компонента (ПР(х 25)), который взаимозаменяем во всех тест-системах производства ООО «НПО «Диагностические системы»;
 - стоп-реагента, который может быть взаимозаменяемым в зависимости от молярности раствора.
 - ТМБ-Субстратного раствора, который взаимозаменяем во всех наборах для диагностики ToRCH-инфекций, производства ООО «НПО «Диагностические системы».

	• Не изменять процедуру проведения анализа. • Не использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке. • Не проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли. • Тщательно промывать лабораторную посуду. • Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение. • Не использовать одну и ту же ванночку для внесения конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора. • Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной (деионизированной). Многократные ванночки для автоматических анализаторов сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной. Затем промыть 70% раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной. • Нельзя допускать высыхания лунок планшета иммуносорбента между отдельными операциями. • Не допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов, субстратов или ТМБ-Субстратного раствора. • Соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполнены, не допускать остатка жидкости в лунках после промывки. • Использовать валидированные пипетки и оборудование, новые наконечники для каждого образца. • Не подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света во время инкубации и хранения.		При распылении образцов немедленно дезинфицировать поверхность 3% раствором хлорамина Б. Отходы, содержащие биологические образцы, нужно нейтрализовать до сброса в канализацию. Твердые отходы должны быть обеззаражены автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °C под давлением 1,5 кг/см² (0,15 МПа). Допустимо обеззараживание твердых отходов способом погружения в 3% раствор хлорамина Б (длительность дезинфекции не менее 1 часа) или другого разрешенного к промышленному выпуску и применению в РФ дезинфицирующего средства. Жидкие отходы (промывочные воды, остатки проб, растворов) обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или другого хлорсодержащего средства. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.
	 	• Не пипетировать ртом. • Промывать руки после работы с набором реагентов и исследуемыми образцами • Избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, субстратного буфера, хромогена, стоп-реагента с кожей и слизистыми.	

 	• В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.	 • Сыворотки крови, используемые при приготовлении К-, не содержат антитела класса G к цитомегаловирусу, HBsAg, антиген p24 ВИЧ-1 и антитела к ВИЧ-1, 2 и вирусу гепатита С. • Сыворотки крови, используемые при приготовлении K₁+, K₂+ содержат антитела класса G к цитомегаловирусу, и не содержат HBsAg, антиген r24 ВИЧ-1 и антитела к ВИЧ-1, 2 и вирусу гепатита С. • При работе с реагентами набора (К-, K₁+, K₂+) и исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
 	• При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами использовать спецодежду и одноразовые перчатки.	

VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

При утилизации и уничтожении все реагенты и материалы, являющиеся отходами, должны быть обработаны в соответствии с действующими нормативами (СанПиН 2.1.7.2790-10, СП 1.3.2322-08, МУ-287-113).

VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Вода дистиллированная или деионизированная;
- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или предварительно устанавливаемые одноканальные или многоканальные пипетки с изменяемым объемом для отбора жидкостей.
- Наконечники одноразовые для пипеток переменного объема;
- Инкубатор микропланшетный (термостат) $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$;
- Устройство для промывания планшетов (вошер);
- Микропланшетный ридер (анализатор иммунологический) (фильтры 450 нм и 620-680 нм).
- Бумага фильтровальная лабораторная;
- Перчатки медицинские.

VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови проводить в соответствии с текущей практикой методом венопункции. Для анализа использовать неразведенную сыворотку/плазму. Во избежание гемолиза нужно как можно быстрее отделить плазму от эритроцитов или сыворотку от сгустка. Образцы, содержащие агрегаты или осадок, осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин (15 мин, $2-8 ^\circ\text{C}$).

Образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией (сильная опалесценция) анализировать нельзя!

Образцы можно хранить в соответствии с требованиями существующих нормативных документов. Длительное хранение допустимо при температуре не выше минус $20 ^\circ\text{C}$ (замораживание/оттаивание не более 1 раза). Во избежание осаждения фибрина плазму размораживать в течение нескольких минут при температуре $(39,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на водяной бане.

I. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:

- Иммуносорбент. Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет и вынуть планшет.
- К-, K₁+, K₂+, Конъюгат, РРС, БР, РД, РС, ТМБ-Субстратный раствор, Стоп-реагент (0,2 моль/л).

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

- Рабочий промывочный раствор (ПР). Содержимое флакона с концентратом ПР (x25) тщательно перемешать. Необходимый объем концентрата развести в 25 раз соответствующим объемом воды дистиллированной или деионизированной (см. табл. № 2) и тщательно перемешать. Хранить в чистой плотно закрытой емкости не более 14 сут. при температуре от 18 до $25 ^\circ\text{C}$ или не более 28 сут. при температуре от 2 до $8 ^\circ\text{C}$.

Таблица 2

Расход реагентов набора при постановке ИФА

	Количество используемых стрипов	2	4	6	8	10	12
ПР	ПР (x 25), мл	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0	
	Вода, мл	96,0	192,0	288,0	384,0	480,0	

3. Хранение неиспользованных реагентов.

После вскрытия флаконов, оставшиеся не использованными жидкие компоненты набора плотно закрыть винтовыми крышками и хранить в упаковке производителя в течении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С, компоненты: Конъюгат, ТМБ-Субстратный раствор хранить не более 3-х месяцев.

После вскрытия неиспользованные стрипы иммуносорбента без рамки поместить в фольгированный пакет (не удаляя силикагель!) и тщательно герметизировать. Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета, или поместить фольгированный пакет со стрипами в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock.

После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С, при условии соблюдения герметизации.

IX. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед использованием набор выдержать 30 мин при комнатной температуре.

1. В лунки вспомогательного планшета внести 90 мкл РРС и 10 мкл исследуемой сыворотки. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием, при этом фиолетово-синий цвет должен измениться на голубовато-зеленый.

2. Внести в лунки 100 мкл K_1+ , K_2+ , К- (в лунки двух параллельных (нечетного и четного) стрипов) – 2 лунки K_1+ , 2 лунки K_2+ , 2 лунки К-.

3. В остальные лунки внести 90 мкл БР и 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток (конечное разведение исследуемых сывороток 1:100). Каждый образец вносить попарно. Содержимое лунок тщательно перемешать пипетированием.

4. Планшет покрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

5. С помощью промывочного устройства содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дезинфицирующим раствором и промыть планшет 4 раза рабочим ПР, осторожно заполняя лунки до краев (не менее 380 мкл в лунку), выдерживая 40 сек и удаляя промывочный раствор в ёмкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использование автоматического вошера. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.

6. В лунки нечетных стрипов внести по 100 мкл РС. В лунки четных стрипов – по 100 мкл РД.

7. Стрипы выдержать 10 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С.

8. Удалить содержимое лунок и промыть планшет 2 раза рабочим ПР как указано в п. 5.

9. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата.

10. Планшет покрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

11. Удалить содержимое лунок и промыть планшет 4 раза рабочим ПР как указано в п. 5.

12. Во все лунки внести по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора.

13. Планшет выдержать в течение 20 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С.

14. Во все лунки внести по 150 мкл стоп-реагента и провести учет результатов при 450/620-680 нм.

Допустим учет результатов при одной длине волны - 450 нм.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении.

X. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реакцию учитывать, если значения оптической плотности (ОП) в лунках с K_1+ (нечетные стрипы) – не менее 0,6, а среднее значение ОП растворов в лунках с К- – не более 0,2.

Индекс авидности рассчитывать по формуле:

$$\text{Индекс авидности} = \frac{\text{ОП исслед. образца (реакция с РД)}}{\text{ОП исслед. образца (реакция с РС)}} \times 100\%$$

Полученные результаты достоверны, если индекс авидности K_1+ не менее 70%, а индекс авидности K_2+ не более 40%.

Интерпретация результатов

Если индекс авидности исследуемой положительной сыворотки менее 40%, то сыворотка содержит низкоавидные антитела, что указывает на первичную инфекцию.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора 18 мес.

Срок годности серии указан на упаковке набора. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Хранение – в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование – при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование и хранение при температуре до 25 °С 10 суток и до 30 °С 5 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя – ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

Для проведения расследования и получения объективных выводов по заявленной рекламации необходимо предоставление:

1. Рекламационного набора;
2. Всех образцов кроводач пациента;
3. Протоколов исследований с использованием других методов с указанием серии, сроков годности;
4. Протоколов исследований с использованием референтных тестов с указанием серии, сроков годности.

ХП. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)		Температурные пределы хранения
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)		Срок годности число/месяц/год
	Производитель		Использовать инструкцию по применению
	Каталожный номер		Содержит раздражающее вещество
	Количество определений	Code: X.X.XX	Идентификационный код
	Номер партии (серии)		

Директор по производству

ООО «Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»

В.К. Пименов

СОГЛАСОВАНО

Зав.кафедрой клинической лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России
д.м.н, профессор

В. В. Долгов



СХЕМА АНАЛИЗА

1	Внести	По 90 мкл РРС и 10 мкл исследуемых образцов (проводить на планшете для предварительного разведения)
2	Внести	По 100 мкл К ₁ +, К ₂ +, К-
3	Внести	По 90 мкл БР
4	Внести	По 10 мкл исследуемых образцов, предварительно разведенных РРС (см. п. 1)
5	Инкубировать	30 мин, (37,0 ± 0,5) °С, инкубатор микропланшетный
6	Промыть планшет	Рабочий ПР, не менее 380 мкл, 4 раза
7	Внести	По 100 мкл РС и РД
8	Инкубировать	10 мин, 18-25 °С в защищенном от света месте
9	Промыть планшет	Рабочий ПР, не менее 380 мкл, 2 раза
10	Внести	По 100 мкл конъюгата
11	Инкубировать	30 мин, (37,0 ± 0,5) °С, инкубатор микропланшетный
12	Промыть планшет	Рабочий ПР, не менее 380 мкл, 4 раза
13	Внести	По 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора
14	Инкубировать	20 мин, 18-25 °С в защищенном от света месте
15	Внести	По 150 мкл стоп-реагента
16	Учет результатов	450 нм/620-680 нм или 450 нм

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ

« 23 ДЕК 2014 » 20__ год

Зав. кафедрой клинической
лабораторной
диагностики ГБОУ ДПО РМАПО
Минздрава России, д.м.н., профессор

Долгов В.В.

