

52
«УТВЕРЖДАЮ»

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



О.Н. Шлюндин

2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-М-ЭКСПРЕСС»
Тест-система иммуноферментная для выявления
антител класса IgM к цитомегаловирусу,
набор диагностический

Разработана впервые

Содержание

I. Введение	3
II. Назначение.....	3
III. Состав набора «ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-М-ЭКСПРЕСС»	3
IV. Аналитические и диагностические характеристики набора.....	4
V. Меры предосторожности.....	4
VI. Инструкции по безопасности.....	5
VII. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемые с набором реагентов.....	6
VIII.Отбор и подготовка образцов	6
IX. Подготовка реагентов	6
X. Проведение анализа	7
XI. Учет результатов	8
XII. Интерпретация результатов	8
XIII.Срок годности. Условия хранения и транспортирования.....	8
XIV. Объяснение символов.....	9

Набор реагентов выпускается в одном комплекте.
Набор рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного использования набора до одной лунки.

. ВВЕДЕНИЕ

Цитомегаловирус (ЦМВ) относится к семейству герпесвирусов. Почти всё взрослое население имеет антитела к ЦМВ. Большинство случаев заражения ЦМВ протекает бессимптомно, однако ЦМВ инфекция может вызвать серьезные заболевания у новорожденных младенцев, либо у людей с ослабленным иммунитетом. Около 2% беременных женщин имеют первичную либо вторичную ЦМВ-инфекцию. Среди рождённых от инфицированных матерей детей признаки заболевания проявляются у 10-20%. Цитомегаловирусная инфекция может протекать практически бессимптомно, но в некоторых случаях клинические симптомы достаточно тяжелые, сопровождаются желтухой, гепатоспленомегалией, поражением центральной нервной системы. Дети, у которых при рождении отсутствуют симптомы заболевания, могут впоследствии развиваться с дефектами слуха. ЦМВ-инфекции часто встречаются у лиц с дефицитом клеточного иммунитета, таких как раковые пациенты или лица с синдромом приобретенного иммунодефицита, или тех, кто получает иммуносупрессоры.

Обнаружение антител к ЦМВ является вспомогательным средством диагностики и определения иммунного статуса пациента.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-М-ЭКСПРЕСС» предназначен для выявления антител класса IgM к цитомегаловирусу (ЦМВ) в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа в экспресс формате.

II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-М-ЭКСПРЕСС»

Таблица 1	
Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки), в лунках которого сорбирован рекомбинантный антиген цитомегаловируса.	1 планшет
Конъюгат, жидкий – поликлональные антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая жёлтого цвета или бесцветная жидкость.	1 флакон 12,0 мл
С+ (контрольный положительный образец), жидкий - сыворотка крови человека, содержащая антитела класса IgM к ЦМВ, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая розового цвета жидкость. или Лунки с инкорпорированным контрольным положительным образцом.	1 флакон 1,5 мл или 16 лунок
С- (контрольный отрицательный образец), жидкий - сыворотка крови человека, не содержащая антитела класса IgM к ЦМВ, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая зелёного цвета жидкость. или Лунки с инкорпорированным контрольным отрицательным образцом.	1 флакон 2,5 мл или 16 лунок
БР (блок-раствор) - слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 100,0 мл
ПР (концентрат х 25) – промывочный раствор. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39°C и встряхивании.	1 флакон 50,0 мл
ГМБ-Субстратный раствор, готовый к применению, жидкий. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 14,0 мл
Стоп-реагент - раствор серной кислоты 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами. Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают планшет для предварительного разведения сывороток, инструкцию по применению.

Дополнительно набор может быть /комплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка для ИФА планшетов	1 шт. 2 шт.
	Одноразовые наконечники	16 шт.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.
	Полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или пластиковая скрепка	1 шт.

IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Чувствительность и специфичность

Оценка чувствительности и специфичности набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-М-ЭКСПРЕСС» проводилась по панели “Anti – CMV Mixed Titer Performance Panel” PTC202(M), VBI Diagnostics. Чувствительность теста составила 100%, специфичность – 100%.

Точность

Внутрисерийная воспроизводимость анализа была оценена при тестировании 3-х положительных образцов в 6 повторах на наборах реагентов одной и той же серии. Коэффициент вариации составил от 2,9 до 6,2 %.

Межсерийная воспроизводимость анализа была оценена при тестировании 3-х положительных образцов на наборах реагентов трех разных серий. Коэффициент вариации составил от 2,4 до 7,5%.

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:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с температурой от 18 до 24 °С.
- Нельзя использовать реагенты с истекшим сроком годности.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме следующих реагентов входящих в состав тест-систем, предназначенных для выявления антител к ToRCH-инфекциям производства ООО «НПО «Диагностические системы»:
 - неспецифические компоненты (ПР (концентрат х 25), стоп-реагент);
 - блок-раствор для рабочего разведения исследуемых сывороток идентичен для тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-М-ЭКСПРЕСС», «ДС-ИФА-АНТИ-ВПГ-1-М-ЭКСПРЕСС», «ДС-ИФА-АНТИ-ВПГ-2-М-ЭКСПРЕСС» и «ДС-ИФА-АНТИ-ВПГ-1,2-М-ЭКСПРЕСС».
 - за более детальной информацией относительно других реагентов обратитесь в нашу службу поддержки пользователей по телефону бесплатной линии 8-800-555-0300 (доб. 7655, 7647) или по E-mail: info@npods.nnov.ru.
- Перед использованием все реагенты выдержать при температуре от 18 до 24 °С в течение 30 мин.
- Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить тест в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на ферментативную активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.
- Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной или деионизированной. Многократные ванночки для автоматических анализаторов необходимо сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной или деионизированной. Затем промыть 70% раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной или деионизированной

- Иммуносорбент допускается хранить в промежутках между отдельными операциями не более 10 мин (нельзя допускать высыхания лунок планшета).
- Ферментативная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстратов.
- Необходимо использовать новый наконечник для каждого образца.
- Промывка лунок - важный этап в данной процедуре: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполнены, не допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.
- Нельзя использовать одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и растворов.
- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование.
- Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- Необходимо использовать воду дистиллированную или деионизированную.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию тепла или света во время инкубации и хранения.

VI. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для диагностики “in vitro”.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении отрицательного контрольного образца, положительного контрольного образца, были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к гепатиту С и ВИЧ-1,2.
- При работе с исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с набором реагентов с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами, реагентами, промывочными растворами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спец. одежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Необходимо избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы. При распыливании немедленно дезактивировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.
- Необходимо избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, стоп-реагента с кожей и слизистыми.
- После проведения ферментативной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/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) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.
- 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).



• Некоторые реагенты содержат Проклин 300. Проклин 300 0,1 % - раздражающее вещество. Может вызвать сенсибилизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промойте область контакта большим количеством мыла и воды.

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

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длинах волн 450 нм, 620-680 нм.
- Пипетки переменного объема (одно- и многоканальные).
- Наконечники одноразовые для пипеток переменного объема.
- Устройство для промывания планшетов (вошер).
- Градуированные цилиндры: 25 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Бумага фильтровальная лабораторная.
- Перчатки медицинские.

VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови должен проводиться в соответствии с текущей практикой. В качестве исследуемых образцов может быть использована сыворотка (плазма) крови человека. Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Образцы можно хранить в соответствии с требованиями существующих нормативных документов. Нельзя использовать сыворотку (плазму), замороженную и размороженную более 1 раза. Исследование образцов с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией не допускается, т.к. может дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием.

IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты готовые к применению

• **Иммуносорбент.** Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть пакет и вынуть планшет. Взять необходимое количество лунок. Неиспользованные лунки без рамки поместить обратно в 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 вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение срока годности при температуре от 2 до 8 °C.

- **Конъюгат.**
- **К+** - контрольный положительный образец, жидкий.
- **К-** - контрольный отрицательный образец, жидкий.
- **БР** - блок-раствор для разведения сывороток. Перед использованием реагент тщательно перемешать.

- **ТМБ-Субстратный раствор.** Перед использованием реагент тщательно перемешать.
- **Стоп-реагент.**

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

При комплектации набора стрипами с инкорпорированными К+ и К-. Лунки упакованы в фольгированные пакеты. Вскрыть пакет и вынуть нужное количество лунок. Неиспользованные лунки поместить обратно в пакет. После вскрытия пакетов лунки стабильны в течение 3 мес. при температуре от 2 до 8 °C, при условии, что пакет герметично закрыт с помощью полиэтиленового пакета с замком Zip-Lock или с помощью скрепки. Не допускается удалять силикагель из пакета.

Рабочий промывочный раствор (ПР). Содержимое флакона с концентратом (х 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимый объем концентрата (х 25) промывочного раствора развести соответствующим объемом воды дистиллированной или деионизированной (см. табл. 2). Полученный раствор тщательно перемешать. Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут. при температуре от 18 до 24 °С или 28 сут. при температуре от 2 до 8 °С.

Хранение неиспользованных реагентов

После вскрытия пакета с иммуносорбентом и флаконов с БР, ПР (концентрат х 25), стоп-реагентом, оставшиеся не использованными реагенты хранить в течение срока годности тест-системы. Конъюгат, К+, К-, ТМБ - Субстратный раствор хранить во флаконах, закрытых винтовыми крышками, в течение 3 мес. при температуре от 2 до 8°С.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при температуре от 18 до 24 °С.

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблице 2:

Таблица 2

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов при ручной постановке ИФА

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор (ПР)	
	ПР (конц х 25) (мл)	Вода дистиллированная или деионизированная (мл)
1	4	96
2	8	192
3	12	288
4	16	384
5	20	480
6	24	576
7	28	672
8	32	768
9	36	864
10	40	960
11	44	1056
12	50	1200

Проведение ИФА

1. Вскрыть фольгированный пакет с иммуносорбентом, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество лунок. Пакет с неиспользованными лунками силикагелем тщательно герметизировать. Для этого поместить вскрытый пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или край пакета с иммуносорбентом свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета.

2. Исследуемые сыворотки развести в 10 раз блок-раствором (БР). Для этого в лунки вспомогательного планшета внести 90 мкл БР и 10 мкл исследуемой сыворотки. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием.

3. При комплектации набора жидкими контрольными образцами.

Контрольные образцы готовы к применению – не разводить!

При внесении образцов в зависимости от количества используемых лунок рекомендуется следующая схема:

- 8-16 лунок - 1 лунка К+, 2 лунки К-;
- Более 16 лунок - 2 лунки К+, 3 лунки К-;

Например, при постановке ИФА на целом планшете, в лунки стрипа А-1 и В-1 пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К+, в 3 лунки С-1, D-1 и Е-1 - по 100 мкл К-.

В остальные лунки внести дозатором по 90 мкл БР и 10 мкл предварительно разведенных образцов исследуемых сывороток (конечное разведение исследуемых сывороток 1:100).

При комплектации набора инкорпорированными контрольными образцами.

Вскрыть пакет с лунками с инкорпорированным К+, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета необходимое количество лунок. Пакет с неиспользованными лунками и силикагелем тщательно герметизировать. Аналогично вскрыть пакеты с лунками с инкорпорированным К-.

В зависимости от количества используемых лунок рекомендуется следующая схема:

8-16 лунок – 1 лунка К+ и 2 лунки К-.

Более 16 лунок – 2 лунки К+ и 3 лунки К-.

Внести в соответствующие лунки с контролями по 100 мкл БР.

В остальные лунки внести дозатором по 90 мкл БР и 10 мкл предварительно разведенных образцов исследуемых сывороток (конечное разведение исследуемых сывороток 1:100).

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 5 мин.!

Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в течение 30 мин при комнатной температуре (18-24 °C).

4. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала (аккуратно, с помощью вошера или многоканальной пипетки), планшет промыть 5 раз рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 350 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала.

5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата и покрытый крышкой или защитной пленкой планшет выдержать 30 мин при комнатной температуре (18-24 °C), после чего планшет промыть 5 раз, как указано в п. 4.

6. Во все лунки планшета внести по 100 мкл ТМБ – Субстратного раствора и выдержать 10 мин при комнатной температуре (18-24 °C) в защищённом от света месте.

7. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-реагента и провести учет результатов.

XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов провести спектрофотометрически при двух длинах волн 450 нм и при референс-длине волны в диапазоне от 620 до 680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учёт результатов при одной длине волны - 450 нм.

Реакцию учитывать, если среднее значение оптической плотности (ОП) в лунке с К- - не более 0,25, а среднее значение ОП растворов в лунках с К+ - не менее 0,5.

ОП крит. рассчитывать по формуле:

$$\text{ОП крит.} = \text{ср. знач. ОП К-} + A$$

где: A - коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе.

XII. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат анализа сывороток считать положительным, если значение ОП исследуемого образца выше 1,1 x ОП крит.

Результат анализа сывороток считать отрицательным, если значение ОП исследуемого образца ниже 0,9 x ОП крит.

Если значение ОП исследуемого образца превышает 0,9 x ОП крит., но меньше значения 1,1 x ОП крит., этот образец считать неопределенным. В этом случае необходимо повторное исследование сыворотки крови пациента на антитела к ЦМВ в динамике – через 1-2 недели после первого забора крови. Желательно, чтобы повторно взятый образец анализировался с предыдущим (парные сыворотки), что позволит с большей достоверностью оценить динамику специфических антител.

XIII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности 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 °C.

Транспортирование - при температуре от 2 до 8°C. Допустимо транспортирование и

«25» ноября 2013г.  Гайденко В.П.