

ВЕКТОР



Набор реагентов тест-система
иммуноферментная для выявления
иммуноглобулинов класса G
к цитомегаловирусу

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ВектоЦМВ-IgG-стрип

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-1554

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВектоЦМВ-IgG-стрип» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к цитомегаловирусу в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца во время первой инкубации происходит связывание IgG к ЦМВ с рекомбинантным антигеном, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок и образование комплекса «антиген-антитело».

Несвязавшийся материал удаляют отмывкой. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена связывается с IgG к ЦМВ, иммобилизованными в ходе первой инкубации. После второй отмывки количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием хромогена – раствора тетраметилбензидина (ТМБ).

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-волне в диапазоне 620–655 нм. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна концентрации IgG к ЦМВ в анализируемых пробах.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок рекомбинантным антигеном цитомегаловируса (ЦМВ), готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+ ; прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^- ; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 3,0 мл;
- конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена (прозрачная жидкость синего цвета) – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25; прозрачная бесцветная жидкость; допускается наличие осадка солей, исчезающего при нагревании от 30 до 40°) – 2 фл. по 28 мл;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС; прозрачная жидкость малинового цвета) – 1 фл., 10 мл;
- раствор для разведения сывороток (PPC; прозрачная бесцветная или светло-желтая жидкость) – 1 фл., 12 мл;

- раствор тетраметилбензида (прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент (прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшетов – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки – 16 шт.;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к ЦМВ по ОСО 42-28-360-01, % – 100.

3.2. Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G к ЦМВ по ОСО 42-28-360-01, % – 100.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

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 набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

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 любой другой возбудитель вирусных инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы.

4.6. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 ,

деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

4.8. Точность и воспроизводимость результатов анализа зависят от строгого выполнения следующих правил:

- не используйте реагенты с истекшим сроком годности;

- при постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест»;

- *запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей;*

- не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

- используйте стеклянную посуду, тщательно вымытую и ополоснутую дистиллированной водой, или (предпочтительно) одноразовую посуду;

- не допускайте высыхания стрипов в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов;

- ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором тетраметилбензидина;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

– необходимо следить за состоянием промывочного устройства – регулярно обрабатывать шланги и емкости 70% этиловым спиртом;

– рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

– никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

– перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протирать конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона с раствором ТМБ;

– проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы;

– если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Ложноположительные результаты могут быть обусловлены:

а) получением неправильного рабочего разведения исследуемых сывороток (например, 1:70; 1:50);

б) контаминацией отрицательных сывороток в рабочем и вспомогательных планшетах положительными сыворотками из соседних лунок; вероятность такой контаминации особенно высока при первичном скрининге исследуемых сывороток, так как на весь планшет обычно выявляется всего несколько отрицательных сывороток.

Для получения правильного рабочего разведения исследуемых сывороток необходимо:

а) при отборе 10 мкл сыворотки для предварительного разведения не погружайте наконечник глубоко в сыворотку, чтобы исключить налипание сыворотки на внешнюю поверхность наконечника.

б) тщательно перемешивайте сыворотку при предварительном разведении 1:10.

Для исключения взаимной контаминации сывороток во вспомогательном планшете для предварительного разведения сывороток и в рабочем планшете необходима тщательная и аккуратная работа, без разбрызгивания растворов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37\pm 1)^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- колба мерная вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;

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°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.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

6.4. Для отбора исследуемых образцов и компонентов набора реагентов использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа исследуемые образцы и все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, следует выдержать при температуре от 18 до 25°C не менее 60 мин.

7.2. Контрольные образцы, конъюгат, раствор ТМБ и стоп-реагент готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

7.3. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

7.3.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

7.3.2. После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение трех месяцев, но в пределах срока годности набора.

7.4. 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 поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C в течение 3 месяцев.

7.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином 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°C до полного растворения осадка.

Хранение: не более 5 суток при температуре 2–8°C.

7.6. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РПРС). Для этого во вспомогательный ряд пробирок или в лунки вспомогательно-го планшета внести по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы), тщательно перемешать. При этом малиновый цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, данный образец может дать неправильный результат.

Хранение: при температуре 18–25°C не более 3 часов.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			ФСБТ, концентрат, мл	Дистил. вода, мл
1	1,0	1,0	2,0	до 100
2	2,0	2,0	4,0	до 150
3	3,0	3,0	6,0	до 200
4	4,0	4,0	8,0	до 250
5	5,0	5,0	10,0	до 300
6	6,0	6,0	12,0	до 350
7	7,0	7,0	14,0	до 400
8	8,0	8,0	16,0	до 450
9	9,0	9,0	18,0	до 500
10	10,0	10,0	20,0	до 550
11	11,0	11,0	22,0	до 600
12	12,0	12,0	24,0	до 100

7.7. ПОДГОТОВКА КОНЪЮГАТА

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

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

7.8. ПОДГОТОВКА РАСТВОРА ТМБ

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

Остатки раствора ТМБ из флакона или ванночки утилизировать (*не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ*).

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

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Раствор РРС перед использованием перемешать встряхиванием.

8.1. Внести контрольные образцы:

- 1 лунка – 100 мкл K^+ ;
- 2 лунки – по 100 мкл K^- .

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови (п. 7.6.), перемешать пипетированием.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 5–7 минут.

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

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.5.), 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 по 100 мкл конъюгата (п. 7.7).

Отрезать пленку требуемого размера. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37°C.

Для внесения конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в комплект набора.

8.4. По окончании инкубации промыть планшет как описано в п. 8.2.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ (п. 7.8.) и инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре 18–25°C.

Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

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

Внимание! *Избегайте контакта с раствором тетраметилбензидина и стоп-реагентом. В случае попадания указанных растворов на кожу и слизистые оболочки необходимо немедленно смыть их большим количеством проточной воды.*

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при одной длине волны – 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

- Внести:** по 100 мкл K^+ , K^- ;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл исследуемых сывороток, предварительно разведенных в РПРС.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора ТМБ.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реактива.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

11. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{\text{ср. К}^-}$).

11.2. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом не должно превышать 0,25 ед. опт. плотн. (о.е.).

Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,80 о.е.

11.3. Оценку результатов проводить при условии полного выполнения положений п. 11.2.

11.4. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{\text{крит.}}$) по формуле:

$$ОП_{\text{крит.}} = ОП_{\text{ср. К}^-} + 0,1$$

11.5. Результат анализа считают **положительным**, если $ОП_{\text{обр.}} \geq ОП_{\text{крит.}}$,

где $ОП_{\text{обр.}}$ – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом сыворотки (плазмы) крови.

Результат анализа считают **отрицательным**, если $ОП_{\text{обр.}} < ОП_{\text{крит.}}$.

11.6. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации IgG к ЦМВ в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ В ВЫЯВЛЕННЫХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

12.1. Если необходимо определить титр антител класса IgG к ЦМВ в выявленных положительных образцах сыворотки (плазмы), непосредственно перед основной реакцией исследуемые образцы необходимо развести (раститровать) на рабочем планшете следующим образом:

В лунки А-1, В-1 внести по 100 мкл K^- , в лунку С-1 – 100 мкл K^+ . В остальные лунки верхнего ряда А-2 – А-12 внести по 180 мкл раствора для разведения сывороток и по 20 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов, перемешать пипетированием. Во все оставшиеся лунки внести по 100 мкл раствора для разведения сывороток.

Многоканальной пипеткой перенести по 100 мкл разведенных образцов сыворотки (плазмы) из лунок верхнего ряда в лунки второго ряда, перемешать (контрольные образцы не титровать). Из лунок второго ряда – в лунки третьего ряда, перемешать. Так же последовательно перенести до последнего ряда. Из последнего ряда сбросить по 100 мкл содержимого лунок. Таким образом, в вертикальных рядах получают последовательные 2-кратные разведения исследуемых образцов.

12.2. Планшет закрыть пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37°C.

12.3. Дальнейший ход анализа аналогичен описанному выше для выявления положительных образцов. Результаты анализа оцениваются аналогично.

12.4. За титр антител класса IgG к ЦМВ принимается последнее разведение исследуемого образца, при котором значение ОП в соответствующей лунке на 0,1 единицы превышает ОП_{ср.} К⁻.

13. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

13.1. Сам факт обнаружения антител класса IgG к ЦМВ в образцах сыворотки (плазмы) пациента не может расцениваться как показатель текущей цитомегаловирусной инфекции. Рекомендуется исследовать парные образцы, полученные в острую и рековалесцентную стадии болезни. Диагностически значимым результатом, подтверждающим развитие заболевания, является более чем 4 кратное увеличение титра антител класса IgG к ЦМВ полученное при постановке парных сывороток на одном планшете.

13.2. Для уточнения диагноза рекомендуется провести дополнительное исследование образца, взятого на ранней стадии заболевания, на наличие антител класса IgM к ЦМВ, а также исследовать методом ПЦР различные биологические жидкости пациента (сыворотку крови, слюну, мочу) на наличие ДНК ЦМВ.

Только рассмотрение результатов ИФА и ПЦР в совокупности с оценкой клинического состояния пациента и эпидемиологической картины заболевания дает наиболее полную возможность постановки окончательного диагноза цитомегаловирусной инфекции.

14. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

14.1. Набор реагентов «ВектоЦМВ-IgG-стрип» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (9 мес). Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание набора не допускается.

14.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 3 месяцев с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности.

14.3. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

**По вопросам, касающимся качества набора реагентов,
следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест»
по адресу:**

630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. /факс (383) 336-73-46,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

За справками и консультацией обращаться:
в лабораторию герпес-вирусных инфекций,
тел. (383) 227-75-43

25.10.10.

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
ТОРСН-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: www.vector-best.ru