

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления антител к основному
предраннему белку ЦМВ в активной
стадии инфекции

"БиоСет-актив-ЦМВ"

РЗН 2013/671

Е-0573 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. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

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

Положительный контрольный образец инактивированный К⁺ 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 р24 ВИЧ-1 и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от +54 до +56 °С в течение 3 ч.

Отрицательный контрольный образец инактивированный К⁻ 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 р24 ВИЧ-1 и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от +54 до +56 °С 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 отдельно 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 K ⁺	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость розового цвета.	0,2 мл 1 пробирка
Отрицательный контрольный образец инактивированный K ⁻	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 К⁺, 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 К⁻ по трем лункам с АГ_{ЦМВ} 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 деионизированная 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 наконечником.

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. Указанные в данном пункте объемы конъюгата относятся к наборам серии 71. Для приготовления рабочего разведения конъюгата при использовании цельного планшета из пробирки с концентратом конъюгата отобрать 420¹ 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 105 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.

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

8.1.1. 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).

¹ Объем отбираемого раствора индивидуален для каждой серии набора и указан в Инструкции, вкладываемой в наборы соответствующей серии.

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	АГ _{ЦМВ}
B	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10	№11	№12	КАГ
C	№13	№14	№15	№16	№17	№18	№19	№20	№21	№22	№23	№24	АГ _{ЦМВ}
D	№13	№14	№15	№16	№17	№18	№19	№20	№21	№22	№23	№24	КАГ
E	№25	№26	№27	№28	№29	№30	№31	№32	№33	№34	№35	№36	АГ _{ЦМВ}
F	№25	№26	№27	№28	№29	№30	№31	№32	№33	№34	№35	№36	КАГ
G	№37	№38	№39	№40	№41	№42	№43	№44	№45	К+	К-	КК	АГ _{ЦМВ}
H	№37	№38	№39	№40	№41	№42	№43	№44	№45	К+	К-	КК	КАГ

8.1.2. 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	
A	№1	№2	№3	№10	№11	№12	№19	№20	№21	№28	№29	№30	АГ _{ЦМВ}
B	№1	№2	№3	№10	№11	№12	№19	№20	№21	№28	№29	№30	КАГ
C	№4	№5	№6	№13	№14	№15	№22	№23	№24	№31	№32	№33	АГ _{ЦМВ}
D	№4	№5	№6	№13	№14	№15	№22	№23	№24	№31	№32	№33	КАГ
E	№7	№8	№9	№16	№17	№18	№25	№26	№27	№34	№35	№36	АГ _{ЦМВ}
F	№7	№8	№9	№16	№17	№18	№25	№26	№27	№34	№35	№36	КАГ
G	К+	К-	КК	К+	К-	КК	К+	К-	КК	К+	К-	КК	АГ _{ЦМВ}
H	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.

8.2. 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, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

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

8.3. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (п. 7.2.). Планшет закрыть сухой крышкой или заклеить новым листом пленки и выдержать в течение 30 мин при температуре $(+37 \pm 1)$ °С.

8.4. Промывание. Повторите процедуры, описанные в п. 8.2.

8.5. 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 °С до +25 °С.

8.6. 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 К _{АГ}	не более 0,30
ОП _{Ср} К ⁺ по АГ _{ЦМВ}	не менее 0,80
ОП _{Ср} К ⁻ по АГ _{ЦМВ}	не более 0,30
ОП _{Ср} К ⁻ по К _{АГ}	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 АГ_{ЦМВ} и ОП по К_{АГ}:

$$A = \text{ОП АГ}_{\text{ЦМВ}} - \text{ОП К}_{\text{АГ}}$$

Результат исследования считается **положительным**, если «величина превышения» для исследуемого образца не ниже значения А критического (А_{КРИТ})². Результат исследования считается **отрицательным**, если «величина превышения» для исследуемого образца ниже А_{КРИТ}.

² значение А_{КРИТ} индивидуально для каждой серии набора и указано в Инструкции, вкладываемой в наборы соответствующей серии, и в паспорте на серию.

$A_{\text{КРИТ}} = 0,350$

Пример:

Допустим, что величина $A_{\text{КРИТ}}$ для данной серии наборов составляет 0,350.

1) Для образца сыворотки № 1 получены следующие значения:

ОП по $АГ_{\text{ЦМВ}}$ - 0,225

ОП по $K_{\text{АГ}}$ - 0,150

$A = 0,225 - 0,150 = 0,075$.

Результат отрицательный.

2) Для образца сыворотки № 2 получены следующие значения:

ОП по $АГ_{\text{ЦМВ}}$ - 0,700

ОП по $K_{\text{АГ}}$ - 0,210

$A = 0,700 - 0,210 = 0,490$.

Результат положительный.

Примечание. Если ОП исследуемого образца в лунке с $K_{\text{АГ}}$ превышает 0,3 о.е., то это означает, что образец дает неспецифическую реакцию из-за наличия большого количества антител к бактериальным антигенам или вследствие несоблюдения правил приготовления и хранения сывороток. В этом случае результат является неопределенным и необходимо повторно взять кровь и провести исследование второго образца одновременно с первым. При повторном неопределенном результате образец следует исследовать другими методами.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор транспортируют и хранят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от +2 °С до +8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование в течение 3 сут при температуре от +9 °С до +30 °С.

Условия отпуска: для диагностики *in vitro* в лечебно-профилактических и санитарно-противоэпидемиологических учреждениях.

Рекламации на качество набора необходимо направлять в ЗАО БТК «Биосервис» по адресу: 115088, г. Москва, а/я 20, тел./факс (495) 674-5605.

11. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК