

И Н С Т Р У К Ц И Я
по применению набора реагентов

"ИФА-ЦМВ-IgG"

**Тест-система иммуноферментная для выявления
иммуноглобулинов класса G к цитомегаловирусу**

Регистрационное удостоверение №ФСР 2008/03911 от "27" февраля 2014 г.

НАЗНАЧЕНИЕ¹

Выявление и определение титра видоспецифических иммуноглобулинов класса G к цитомегаловирусу (ЦМВ) в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	нативный инактивированный очищенный антиген цитомегаловируса (ЦМВ), сорбированный на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном (используются "ломающиеся" стрипы)	1 планшет
	<i>допускается отдельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)</i>	
Контрольный положительный образец (K ⁺)	инактивированный; содержит иммуноглобулины класса G к ЦМВ в титре 1:1000 или 2,0 PE/мл ² прозрачная красного цвета жидкость	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный образец уровня среза (K ⁺ _{пор})	инактивированный; содержит иммуноглобулины класса G к ЦМВ в «пороговом» титре (1:100 или 0,2 PE/мл ²); прозрачная желтого цвета жидкость	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	инактивированный; прозрачная зеленого цвета жидкость	1 фл. (1,2 мл)
Конъюгат	антитела моноклональные мышинные против иммуноглобулинов человека класса G, меченые пероксидазой хрена; прозрачная розового цвета жидкость	1 фл. (13 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	прозрачная жидкость синего цвета	1 фл. (15 мл)
Раствор для предвари-тельного разведения образцов (РПРО)	прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (15 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин.	1 фл. (80 мл) или 2 фл. (по 40 мл)
Раствор индикаторный (РИ);	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл.

¹ Взамен инструкции, утвержденной 07.07.2005 г, № 01-011/123-05.
PE/мл – единицы содержания IgG к ЦМВ (единицы института Пауля Эрлиха), принятые ВОЗ.

Примечания. 1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(х25), РИ, РРО, РПРО, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты.

Набор может быть дополнительно укомплектован:

вспомогательным планшетом для предварительного разведения образцов (1 шт.),

вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),

одноразовыми наконечниками для автоматических пипеток (16 шт.)

клеякой пленкой для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению и бланк калибровочного графика.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации набора позволяет одномоментное исследование 96 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 6 лунок, одна лунка – для определения уровня "бланк"). Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Число иссл. обр.	1	2-9	10-17	18-25	26-33	34-41	42-49	50-57	58-65	66-73	74-81	82-89

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемом образце иммуноглобулинов класса G к ЦМВ происходит связывание их с антигенами ЦМВ, сорбированными в лунках планшета-иммуносорбента, образовавшийся комплекс антиген-антитело реагирует с внесенным в реакционную среду раствором конъюгата – антителами к IgG человека, мечеными пероксидазой. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело-конъюгат" выявляется в реакции с субстратно-индикаторным раствором, содержащим хромоген – тетраметилбензидин, в результате которой меняется цвет (оптическая плотность) реакционной смеси в лунке планшета; изменение регистрируется спектрофотометрически.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Нативная сыворотка (плазма) крови человека объемом не менее 10 мкл.

Образцы сыворотки (плазмы) крови до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С и 3 мес при температуре минус 20 °С или более низкой. Допускается только однократное замораживание-размораживание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность при проверке на сыворотках стандартизованной панели предприятия или на аналогичных коммерческих панелях, разрешенных к использованию в РФ, – 100 %.

Набор рассчитан на определение содержания IgG к ЦМВ в диапазоне титров от 1:100 до 1:1000 (от 0,2 РЕ/мл до 2,0 РЕ/мл).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы (для "ручной" постановки)

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин, термостат на 37 °С, холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Предварительное разведение исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести 1:10 во вспомогательном планшете, для чего внести в его лунки по 90 мкл РПРО, затем внести в них по 10 мкл сыворотки, тщательно перемешать пипетированием. При этом розовый цвет должен измениться на желтый. Если изменение цвета не произошло, данный образец необходимо исследовать повторно с целью исключения неправильных результатов. Рабочее

разведение (1:100) готовить непосредственно в лунках иммуносорбента (см. раздел **Проведение ИФА ("ручная" постановка)**, п. 2).

Рабочие разведения образцов хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

При постановках с использованием ИФА-анализаторов 80 мл ФСБ-Т(х25) довести водой очищенной до 2 л.

При дробной "ручной" постановке использовать соотношения объемов ФСБ-Т(х25) и воды, указанные в табл. 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1

Число стрипов	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т(х25), мл	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищенная, мл	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, К⁺, К⁻, К⁺_{пор}, РРО, РПРО, конъюгат, РИ, стоп-реагент – готовы к применению.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Проведение ИФА ("ручная" постановка)

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из упаковки рамку планшета и необходимое число стрипов. Неиспользованные стрипы допускается хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

2. В лунку А1 внести 100 мкл РРО, в следующие лунки внести по 100 мкл контрольных образцов (по 2 лунки на образец), оставшиеся лунки использовать для исследуемых образцов (по 1 лунке на образец), для чего внести в них: вначале по 90 мкл РРО, а затем – по 10 мкл образцов, предварительно разведенных 1:10 в лунках вспомогательного планшета (см. раздел «Предварительное разведение исследуемых образцов»), тщательно перемешать пипетированием.

3. Инкубировать планшет 30 мин при температуре от 21 до 25°С в защищенном от света месте.

4. С помощью промывателя удалить содержимое лунок, 4 раза промыть планшет промывочным раствором, внося в лунки 350-370 мкл раствора. При наличии промывателя, позволяющего производить промывку в режиме "Overflow", использовать именно этот режим. По окончании промывки остатки раствора удалить

из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата.

6. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой, инкубировать 30 мин при температуре от 21 до 25°C в защищенном от света месте.

7. С помощью промывателя удалить содержимое лунок, 4 раза промыть планшет как указано в п. 4.

8. Во все лунки внести по 100 мкл раствора индикаторного, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и инкубировать 10–15 мин при температуре от 21 до 25°C.

9. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился субстратно-индикаторный раствор) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и не более чем через 10 мин приступить к учету результатов.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, выводя спектрофотометр на нулевой уровень ("бланк") по лунке А1 и измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм.

Результаты ИФА учитывать при следующих условиях:

среднее значение $ОП_{K+}$ – не менее 0,60;

среднее значение $ОП_{K+пор}$ – не менее 0,20;

отношение среднего значения $ОП_{K+}$ к среднему значению $ОП_{K+пор}$ – не менее 1,5;

среднее значение $ОП_{K-}$ – не более 0,10.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Качественный учет результатов

Исследуемые образцы учитывать:

как положительные при $ОП_{обр}$ выше $1,1 \times ОП_{K+пор}$,

как отрицательные при $ОП_{обр}$ ниже $0,9 \times ОП_{K+пор}$.

Образцы с ОП в пределах от $0,9 \times ОП_{K+пор}$ до $1,1 \times ОП_{K+пор}$, т.е. в так называемой "серой" зоне, рекомендуется исследовать повторно, поскольку результаты, полученные в ней, не могут быть однозначно интерпретированы. При повторном получении указанного результата, образцы считают отрицательными.

Определение титра антител (или их содержания в РЕ/мл)

Для определения титра антител класса G к ЦМВ (или их содержания в РЕ/мл) на стандартном бланке (входит в состав набора) строится калибровочный график. Для этого по оси абсцисс (логарифмическая шкала) откладываются значения титров K^+ (1:1000) и $K^+_{пор}$ (1:100) или соответствующее им содержание антител в РЕ/мл (2,0 РЕ/мл и 0,2 РЕ/мл, соответственно), а по оси ординат (пропорциональная шкала) – средние значения ОП в лунках с этими образцами, полученные в ИФА. Полученные точки соединяются прямой линией. Титр антител в исследуемых образцах (или их

содержание в РЕ/мл) определяется по калибровочному графику как абсцисса точки, ордината которой равна полученному в ИФА значению ОП.

Если ОП_{образца} превышает ОП_{к+}, для более точного определения титра рекомендуется при повторном анализе развести данный образец дополнительно в 10 раз (конечное разведение 1:1000). Повторить анализ и полученное по графику значение титра (или РЕ/мл) увеличить в 10 раз.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

В упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 °С до 8 °С. Замораживание не допускается.

Транспортирование

При температуре от 2 °С до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 °С до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК и в учреждение, уполномоченное Росздравнадзором на проведение государственного контроля качества указанной продукции.

КРАТКАЯ СХЕМА ИФА
(ИФА-ЦМВ-IgG)

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести	в лунку А1– 100 мкл РРО, в лунки В1, С1- по 100 мкл К ⁺ , в лунки D1, E1-по 100 мкл К ⁺ _{пор} в лунки F1,G1 –по 100 мкл К ⁻ , в остальные лунки – вначале по 90 мкл РРО, а затем – по 10 мкл образцов, предварительно разведенных 1:10 в лунках вспомогательного планшета (см. раздел «Предварительное разведение исследуемых образцов»)
Инкубация	30 мин, 21-25 °С
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	по 100 мкл конъюгата в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 21-25 °С
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	по 100 мкл индикаторного раствора в каждую лунку
Инкубация	10-15 мин, 21-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по лунке А1

Май 2014 г.