

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления антител к цитомегаловирусу в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа

"БиоСкрин-ЦМВ"

БиоСкрин-ЦМВ

E-0545

Настоящая инструкция распространяется на тест-систему иммуноферментную "ЦМВ-скрин" для выявления антител к цитомегаловирусу человека (ЦМВ), которая представляет собой набор реагентов для иммуноферментного анализа (ИФА), включающий следующие компоненты:

1) **иммуносорбент** - специфический инактивированный антиген цитомегаловируса человека (АгЦМВ), сорбированный в лунках полистиролового планшета (в рядах планшета А, С, Е, G), и контрольный антиген (кАг), сорбированный в лунках полистиролового планшета (в рядах В, D, F, H);

2) **положительный контрольный образец (К+)** - сыворотка крови человека, содержащая антитела к цитомегаловирусу человека - инактивированная прогреванием при температуре 56 °С в течение 30 минут;

3) **отрицательный контрольный образец (К-)** - сыворотка крови человека или сывороточный альбумин человека, не содержащие антител к цитомегаловирусу человека - инактивированная прогреванием при температуре 56 °С в течение 30 минут;

К+, К-:

а) аморфные порошки белого или светло-розового цвета, гигроскопичны,

б) опалесцирующие прозрачные жидкости: К+ - розового цвета, К- - синего цвета.

4) **конъюгат** - антитела диагностические против иммуноглобулинов человека, меченные пероксидазой хрена:

а) аморфный порошок белого или светло-желтого цвета, гигроскопичен,

б) прозрачная жидкость;

5) **субстратная буферная смесь с гидроперитом (БСГ)** - для приготовления раствора хромогена:

прозрачная жидкость (готовая к употреблению);

6) **хромоген (тетраметилбензидин-ТМБ):**

прозрачная жидкость.

7) **стабилизатор (СТ):**

казеин - непрозрачная жидкость белого или желтоватого цвета;

8) **концентрат (25х) раствора №1** - для отмывания планшетов и приготовления разведений сывороток и конъюгата (концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, ФСБ-Т):

прозрачная или опалесцирующая пенящаяся жидкость; при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при 35-37 °С в течение 30 минут.

Тест-система рассчитана на проведение 96 анализов, включая контрольные.

НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментная тест-система предназначена для выявления антител к цитомегаловирусу в сыворотке крови человека.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

ПРИНЦИП ТЕСТИРОВАНИЯ. На поверхности лунок планшета для иммунологических реакций адсорбированы антигены цитомегаловируса человека. При инкубации в лунках планшета исследуемых образцов сывороток антитела, специфичные к белкам цитомегаловируса человека, взаимодействуют с адсорбированными антигенами, образуя иммунные комплексы. После отмывки несвязавшихся антител в лунки добавляют конъюгат (антитела против иммуноглобулинов человека, меченные пероксидазой хрена), который взаимодействует с вирусоспецифическим комплексом антиген-антитело. После отмывки связавшийся конъюгат выявляют с помощью раствора хромогена (тетраметилбензидина) в присутствии перекиси водорода, который приобретает окраску от светло-голубой до голубой. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антител к цитомегаловирусу человека в образце. При отсутствии в исследуемом образце антител к цитомегаловирусу человека иммунные комплексы не образуются, и раствор хромогена не окрашивается. После остановки ферментативной реакции раствором серной кислоты измеряют оптическое поглощение окрашенного раствора в лунках планшета с помощью спектрофотометра при длине волны 450 нм.

Перед проведением исследований необходимо внимательно изучить все разделы инструкции!

Для проведения анализа используйте сыворотку крови, взятой из вены или пальца, в количестве не менее 1,5 мл.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, следует осветлять центрифугированием. Сыворотку следует хранить при 2-10 °С не более 5 суток. При температуре минус 15 °С и ниже допускается хранить сыворотку до одного года. При этом не рекомендуется многократное оттаивание и замораживание образцов.

ВНИМАНИЕ! Исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом может привести к получению ложных результатов.

Каждый образец сыворотки или буферного раствора необходимо отбирать новым наконечником.

Недопустимо использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов!

Не следует проводить анализ образцов таким образом, чтобы на одного оператора одновременно приходилось более четырех планшетов.

Со всеми тестируемыми образцами, отработанными растворами, а также оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, следует обращаться как с потенциально зараженными объектами:

- все отработанные растворы обрабатывать 3 %-ным раствором хлорамина или 6 %-ным раствором перекиси водорода при комнатной температуре в течение 3 ч;
- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой, а затем подвергать автоклавированию;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-ным спиртом.

Для анализа дополнительно требуются следующие материалы и оборудование:

- дистиллированная или деионизованная вода;
- серная кислота квалификации "хч" или "осч" ;
- хлорамин или перекись водорода для обеззараживания;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;
- пипетки одноканальные автоматические для подачи жидкостей в объеме от 10 до 1000 мкл;
- пипетки 12-канальные (8-канальные) для подачи жидкости в объеме от 50 до 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые на 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые на 1000 мкл;
- центрифуга настольная на 7-10 тыс. об/мин;
- пробирки центрифужные полипропиленовые на 1,5-2,2 мл для хранения и осветления образцов сыворотки;
- мерные стаканы или цилиндры на 25-50 и 500 мл;
- ванночки для реагентов или стеклянные чашки Петри;
- воздушный термостат на 37 °С;
- аппарат для промывания планшетов (не обязательно);
- встряхиватель (вибратор) для планшетов (не обязательно);
- спектрофотометр для измерения оптического поглощения на 450 нм;
- контейнер для сброса зараженных твердых отходов;
- автоклав для инактивации зараженных отходов;
- контейнер для слива зараженных жидкостей;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага;
- полиэтиленовая пленка.

1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

Перед постановкой реакции все используемые растворы выдержите при комнатной температуре около 30 минут и тщательно взбалтывайте.

1.1 Раствор №1 - для отмывания планшетов.

При выпадении в концентрате кристаллов прогрейте его перед разведением при температуре 35-37 °С до полного растворения. Интенсивно взболтайте содержимое флакона. Разведите 12 мл концентрата (25х) раствора №1 в 300 мл дистиллированной или деионизованной воды.

Хранить не более 3 суток при температуре 2-10 °С.

1.2. Раствор №2 - для приготовления разведений сывороток и конъюгата.

В 100 мл раствора №1 разведите содержимое ампулы (флакона) со стабилизатором, тщательно ополаскивая флакон или ампулу полученным раствором. Время растворения при перемешивании - не более 30 мин.

Хранить не более 24 ч при 2-10 °С.

1.3. Рабочий раствор хромогена (ТМБ).

Готовят перед использованием в защищенном от света месте.

Отберите 10 мл раствора БСГ (раствор №6), поместите в чистую емкость и добавьте 1 мл раствора ТМБ, тщательно перемешайте.

ВНИМАНИЕ! При манипуляциях с реагентами, содержащими ТМБ, необходимо избегать их попадания на незащищенную кожу и слизистые оболочки; в случае контакта - промывать большим количеством воды. Посуду и наконечники пипеток, контактировавшие с раствором хромогена, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, т.к. даже их следы приводят к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе пероксидазной реакции. Избегайте также контакта раствора хромогена с металлами.

Нельзя использовать раствор ТМБ, если он приобретает в процессе приготовления голубое окрашивание.

1.4. Раствор конъюгата.

Из пробирки с конъюгатом отберите 0,3 мл, перенесите в чистую емкость и добавьте 12 мл раствора №2. Тщательно перемешайте.

Рабочий раствор конъюгата хранить не более 15 мин при 4-25 °С в защищенном от света месте.

1.5. Раствор серной кислоты (2,5 моль/л) для остановки пероксидазной реакции (в наборе не поставляется).

К 43 мл дистиллированной воды добавьте 7 мл концентрированной серной кислоты квалификации "хч" или "осч" и перемешайте (недопустимо добавлять воду в кислоту).

Хранение не ограничено.

Для контроля пригодности раствора серной кислоты к 1 мл раствора хромогена с БСГ добавьте 0,5 мл раствора серной кислоты и выдержите 15 мин в защищенном от света месте при комнатной температуре. Раствор должен оставаться бесцветным.

2. ПОДГОТОВКА СЫВОРОТОК

2.1. Подготовка контрольных образцов (К+, К-) (в наборе с жидкими контрольными образцами).

Из пробирки с каждым контрольным образцом отберите 0,05 мл, перенесите в чистую пробирку и добавьте 0,45 мл раствора №2 (рабочее разведение):

Перемешайте пипетированием. Последующее разведение не требуется.

Рабочее разведение сыворотки храните при 2-10 °С не более 24 часов.

2.2. Подготовка испытуемых сывороток.

Испытуемые сыворотки разведите 1:100 раствором №2 во вспомогательных пробирках или на пластиковых панелях с лунками вместимостью 2 мл. Например, внесите во все вспомогательные пробирки/лунки по 0,5 мл раствора №2. Затем внесите по 5,0 мкл испытуемой цельной сыворотки, перемешивая пипетированием или с помощью вибратора.

Разведенные испытуемые сыворотки не храните!

3. ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

3.1. Планшеты освободите от упаковки и разместите на рабочем месте.

3.2. Порядок внесения исследуемых и контрольных образцов сывороток.

3.2.1. Внесение исследуемых образцов сывороток.

По 100 мкл каждого из предварительно разведенных (1:100) испытуемых образцов (п.2.2) внесите в две лунки вертикального ряда, как показано на рис. 1. Оставьте незаполненными 12 лунок для контролей.

3.2.2. Внесение контрольных образцов сывороток.

В четыре лунки 9(G,H) и 10(G,H) внесите по 100 мкл рабочего разведения K- (п.2.1); в четыре лунки 7(G,H) и 8(G,H), внесите по 100 мкл рабочего разведения K+ (п.2.1); в четыре лунки 11(G,H) и 12(G,H) вместо сывороток внесите по 100 мкл раствора №2 (контроль конъюгата, "КК").

Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным и быстрым перемешиванием раствора в лунке с помощью наконечника автоматической пипетки или с помощью встряхивателя (вибратора).

Планшет заклейте пленкой или закройте чистой крышкой и инкубируйте в течение 1 часа при 37 °С.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	№1	№2											АгЦМВ
B	№1	№2											кАг
C													АгЦМВ
D													кАг
E													АгЦМВ
F													кАг
G							K+	K+	K-	K-	КК	КК	АгЦМВ
H							K+	K+	K-	K-	КК	КК	кАг

Рис. 1. Расположение лунок с сорбированными антигенами ЦМВ (АгЦМВ) и контрольным антигеном (кАг) на рабочем планшете и схема внесения исследуемых и контрольных образцов сывороток.

3.3 Удалите раствор сывороток из лунок с помощью промывателя, затем планшет 5-кратно промойте раствором №1, внося в лунки не менее 0,2 мл раствора, выдерживая залитые планшеты не менее 15 секунд и полностью удаляя промывающий раствор. По окончании промывания тщательно удалите влагу из лунок, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

3.4. Во все лунки планшета внесите по 100 мкл раствора конъюгата (п.1.4). Планшет закройте сухой крышкой или заклейте новым листом пленки и инкубируйте в течение 1 часа при 37 °С.

3.5. Удалите раствор конъюгата из лунок с помощью промывателя, затем планшет 5-кратно промойте раствором №1, как описано в п.3.3, после чего тщательно удалите влагу.

3.6. В каждую лунку планшета внесите по 100 мкл раствора хромогена (субстратно-индикаторной смеси) (п.1.3).

Планшет накройте крышкой и поместите в защищенное от света место на 20-25 мин при температуре 15-25 °С.

Не располагайте планшеты стопкой!

3.7. Остановите пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл раствора серной кислоты в концентрации 2,5 моль/л (п.1.1.5) и немедленно проведите учет результатов.

4. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ИФА

Измерение оптической плотности (ОП) проводите при длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществляйте только по воздуху.

4.1. Проверка правильности проведения опыта.

Результаты измерения оптической плотности (ОП) для контрольных образцов должны удовлетворять следующим требованиям:

среднее значение ОПкк по четырем лункам (с АгЦМВ и кАг) должно быть	не выше 0,2;
при исследовании К+ разность (ОПАгЦМВ – ОПкАг) должна быть	не менее 0,5;
при исследовании К- разность (ОПАгЦМВ – ОПкАг) должна быть	менее 0,2.

В случае соблюдения всех этих условий можно приступить к учету результатов анализа исследуемых образцов. В противном случае реакцию необходимо переставить.

4.2. Учет результатов исследований.

Для каждой сыворотки вычислите разность (ОПАгЦМВ– ОПкАг). Если разность (ОПАгЦМВ_ ОПкАг) больше 0,21, то сыворотка расценивается как положительная, т.е. содержащая антитела к цитомегаловирусу.

Если разность (ОПАгЦМВ - ОПкАг) меньше 0,15, то сыворотка расценивается как отрицательная, т.е. не содержащая антител к цитомегаловирусу.

Если разность ОП в лунках с вирусным и контрольным антигенами находится в интервале 0,15 - 0,21, сыворотка расценивается как сомнительная и подлежит повторному тестированию в разведении 1:25. Если при повторном исследовании сыворотки разность ОП меньше 0,20, то сыворотка считается отрицательной, не содержащей антител к цитомегаловирусу. Если при повторном исследовании

сыворотки разность ОП больше или равна 0,20, то сыворотка считается положительной, содержащей антитела к цитомегаловирусу.

Высокое значение ОП, превышающее 0,60, при взаимодействии сыворотки с контрольным антигеном свидетельствует о неудовлетворительном ее состоянии (длительное хранение, бактериальное загрязнение, наличие консервантов и т.д.). Интерпретация результатов исследования таких сывороток затруднена, поэтому необходимо тестировать другой повторно полученный образец.

Данный препарат предназначен только для установления иммунного статуса пациента в отношении цитомегаловируса.

ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-система выпускается в виде набора реагентов, упакованных в коробку:

Наименование компонентов	Количество
1. Иммуносорбент	2 шт.
2. К+ - по 0,2 мл (жидкая) во флаконе	1 шт.
3. К- - по 0,2 мл (жидкая) во флаконе	1 шт.
4. Конъюгат - 0,9 мл (жидкий) в пластиковой пробирке на 2 мл	1 шт.
5. Буферная смесь с гидроперитом (БСГ) - по 26 мл во флаконе	1 шт.
6. Хромоген (ТМБ) - по 2,5 мл во флаконе	1 шт.
7. СТ (БСА или казеин) - по 1,0 мл во флаконе	1 шт.
8. Концентрат раствора №1 (ФСБ-Т) - по 26 мл во флаконе	2 шт.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Наборы хранят и транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре 2-8°C в условиях, исключающих замораживание.

Срок годности - 12 месяцев со дня выпуска.