



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА  
РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И  
ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА  
IgG К ЦИТОМЕГАЛОВИРУСУ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ  
ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА  
ИФА-ЦМВ-IgG**

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь  
28.05.2009 г.

**1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА**

1.1 Набор предназначен для качественного и полуколичественного анализа сыворотки или плазмы крови человека на наличие антител класса IgG к цитомегаловирусу методом иммуноферментного анализа.

**2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

**2.1 Общая характеристика**

Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) – вирусное заболевание, характеризующееся разнообразными клиническими проявлениями, с преимущественным поражением гематопозитической системы. Возбудителем является ДНК-содержащий вирус – цитомегаловирус (ЦМВ), который относится к семейству Herpesviridae. В подавляющем большинстве случаев ЦМВИ протекает в виде бессимптомного носительства и лишь на фоне первичного или вторичного иммунодефицита способна проявляться как заболевание. Лабораторная диагностика ЦМВИ основана на определении специфических антител (IgG и IgM) в сыворотке крови и других биологических жидкостях наряду с различными методами выявления антигена и ДНК вируса. Среди серологических методов диагностики ЦМВИ наиболее распространенным является метод иммуноферментного анализа (ИФА), характеризующийся высокой чувствительностью и специфичностью. Определение в динамике специфических к ЦМВ IgG методом ИФА может дать наиболее убедительные доказательства первичного инфицирования или реактивации цитомегаловирусной инфекции.

**2.2. Состав набора:**

№	Наименование компонента	Количество
1	Иммунсорбент	1 шт
2	Конъюгат	1 микропробирка; 1,5 мл
3	(К)	1 микропробирка; 0,35 мл
4	(К')	1 микропробирка; 0,2 мл
5	КРП	2 флакона, 25 мл
6	РРС	1 флакон, 15 мл
7	Раствор ТМБ	1 флакон, 8 мл
8	СБР	1 флакон, 8 мл
9	РРК	1 флакон, 15 мл
10	Стоп-реагент	1 флакон, 15 мл
11	Клейкая пленка	3 шт.

Принцип анализа ИФА-ЦМВ-IgG базируется на методе твердофазного непрямого ИФА.

При внесении в лунки образцов исследуемых сывороток антитела класса IgG к цитомегаловирусу, в случае их наличия, связываются с рекомбинантными антигенами цитомегаловируса, сорбированными на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы выявляют при помощи пероксидазного конъюгата моноклональных антител к иммуноглобулину класса IgG человека. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют субстратный буферный раствор (перекись водорода) и раствор ТМБ. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность смеси в лунках при длине волны 450/620 нм, которая пропорциональна концентрации специфических IgG антител к цитомегаловирусу в образцах сывороток или плазмы крови.

Для оценки изменения уровня антител в динамике результат анализа может быть выражен в диагностических единицах (ДЕ).

2.3. Набор рассчитан на проведение 96 анализов (включая контроли).

**3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ**

3.1 Рекомбинантные антигены-полипептиды, синтезированные в бактериях E.coli и содержащиеся в наборе "ИФА- ЦМВ-IgG " являются биологически безопасными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как

потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.5 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

**4. ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ**

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток (плазмы), содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток или плазмы хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20 °С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

Необходимо помнить, что образец с добавленным азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина или бактериальным проростом не пригоден для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

**5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ,  
НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

- 5.1 Фотометр для измерения оптической плотности;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
  - пипетки одноканальные полуавтоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,010 до 5,0 мл (от 10 до 5000 мкл);
  - пипетки 8-ми канальные полуавтоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,03 до 0,3 мл (от 30 до 300 мкл);
  - суховоздушный термостат настроенный на температуру 37 °С;
  - мерные цилиндры вместимостью 10, 50 и 1000 мл;
  - стакан мерный вместимостью 3000 мл;
  - ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
  - флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
  - клейкая пленка или крышка;
  - бумага фильтровальная;
  - перчатки резиновые хирургические;
  - вода дистиллированная;
  - контейнер для сбора твердых отходов;
  - контейнер для слива жидких отходов.

**6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА  
(из расчета на 96 лунок)**

6.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при комнатной температуре (18-22) °С в течение 30 мин.

6.2 Приготовление раствора для промывания планшета  
Если КРП содержит кристаллы, его необходимо прогреть при температуре (35-37)°С до полного растворения кристаллов.

Содержимое флакона с КРП интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. Отобрать 48 мл концентрата в мерный стакан вместимостью 3000 мл, добавить 2160 мл дистиллированной воды и перемешать раствор стеклянной палочкой в течении (40-60) с.

6.3 Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении  
**ВНИМАНИЕ!** Раствор конъюгата готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит!

В чистый флакон (с пробкой) вместимостью 20 мл внести 10 мл РРК, добавить 1 мл конъюгата. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

6.4 Приготовление ТМБ-субстратного раствора  
ВНИМАНИЕ! ТМБ-субстратный раствор готовят непосредственно перед использованием!

В чистый флакон (с пробкой) вместимостью 20 мл внести 6 мл СБР, добавить 6 мл раствора ТМБ и интенсивно перемешать смесь в течение (20-30) с.

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием ТМБ-субстратный раствор должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с ТМБ-субстратным раствором, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники

### 7 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматическое или полуавтоматическое устройство для промывания планшетов – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них; лунки должны заполняться до краев (0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;
- полностью удалить раствор из лунок.
- на поверхности рамки и стрипов после последней аспирации не должно быть остатков жидкости. Удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге;
- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

### 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Иммуносорбент освободить от упаковочного пакета.  
8.2 Приготовить раствор для промывания планшета (п.6.2) и раствор конъюгата (п. 6.3).

8.3 Все лунки промыть 1 раз раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п. 7).

8.4 Внести в лунки по 0,090мл (90 мкл) РРС;

8.5 Внести:  
- в лунку А1 – 0,010 мл (10 мкл) (K<sup>+</sup>),  
- в лунки В1 и С1 – по 0,010 мл (10 мкл) (K<sup>-</sup>),  
- в остальные лунки – по 0,010 мл (10 мкл) исследуемых сывороток.

При внесении контрольных и исследуемых сывороток необходимо осторожно пипетировать смесь в лунках (во время пипетирования происходит изменение цвета раствора).

8.6 Накрыть планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубировать при температуре (37±2) °С в течение 60 минут.

8.7 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки, затем все лунки промыть 4 раз раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п. 7).

8.8 Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора конъюгата .

8.9 Планшет заклеить новой пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при комнатной температуре (18-25)°С в течение 30 мин.

8.10 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки, затем все лунки промыть 6 раз раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п. 7).

8.11 Приготовить ТМБ-субстратный раствор (п.6.4).

8.12 Внести в лунки планшета по 0,1 мл (100 мкл) ТМБ-субстратного раствора. Планшет заклеить новой пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при комнатной температуре (18-25)°С в защищенном от света месте в течение 30 мин.

8.13 Остановить реакцию путем внесения во все лунки планшета по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента (в той же последовательности внесения, что и ТМБ субстратный раствор).

8.14 Не позже чем через 5 мин после остановки реакции, определить оптическую плотность (ОП) в лунках в двухволновом режиме: при длине волны 450 нм относительно 620 нм.

Примечание: оптическую плотность можно измерять в одноволновом режиме (450 нм) относительно пустой лунки (бланк). Необходимо предусмотреть пустую лунку при анализе.

### 9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1 Результаты учитывают только при соблюдении следующих условий:

- ОПср (K<sup>-</sup>) не должно превышать 0,2 ОЕ;
  - ОП (K<sup>+</sup>) должно быть не ниже 0,6 ОЕ.
- Если одно из двух значений ОП (K<sup>-</sup>) больше 0,2 ОЕ его отбрасывают.

9.2 При соблюдении выше перечисленных условий вычислить граничное значение ОП (ГЗ) по формуле (1)

$$ГЗ = ОПср (K<sup>-</sup>) + 0,2 \quad (1),$$

где 0,2 – константная величина.

9.3 Определите “серую зону”. “Серая зона” - зона значений ОП, от ГЗ до значений ОП меньших ГЗ на 10%.

Используя определенное значение ГЗ и значение “серой зоны” проводят оценку результатов по каждому образцу сывороток.

Образец считается положительным, если значение ОП данного образца выше ГЗ.

Образец считается отрицательным, если значение ОП данного образца меньше нижнего уровня ОП “серой зоны”.

Образцы со значением ОП в пределах “серой зоны” считаются неопределенными. В этом случае тест рекомендуется повторить в двух лунках. Если результат снова будет неопределенным, необходимо повторить исследование сыворотки крови больного через 10-14 дней. Если при повторном тестировании результат снова будет в данном интервале значений, он считается отрицательным.

### 9.4 Оценка результатов в диагностических единицах

Для оценки изменения уровня антител в динамике рекомендуется оценивать результат анализа в диагностических единицах (ДЕ):

$$ДЕ = \frac{ОП сыворотки \times 10}{ГЗ} \quad (1)$$

Если ОП исследуемого образца больше 2,5 ОЕ, рекомендуется исследовать эту сыворотку, предварительно разведенную 1:10 раствором для разведения сывороток (конечное разведение в лунке 1:100). В этом случае учет результатов в ДЕ осуществляют по формуле:

$$ДЕ = \frac{ОП сыворотки \times 100}{ГЗ}$$

Результат каждого анализа оценивают следующим образом:

> 10 ДЕ	положительный
9 – 10 ДЕ	неопределенный
< 9	отрицательный*

\*В случае ранней цитомегаловирусной инфекции результат может быть отрицательным. При наличии клинических проявлений рекомендуется провести повторное тестирование через 10-14 дней.

Для постановки диагноза следует учитывать не только данные серологического теста, но и клиническую картину заболевания.

### 10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1 Набор транспортируется всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С.

10.2 Хранение набора должно производиться в чистом, сухом и темном помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Замораживать набор запрещается.

10.3 Срок годности набора – 1 год.

### Библиография

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г. О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ № 351 от 16.12.98 г. Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [3] ОСТ 42-21-2-85  
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения . Методы, средства и режимы