



Набор ИФА для полуколичественного и качественного определения в сыворотке и плазме антител класса IgG к цитомегаловирусу (ЦМВ)

Каталог. № : CMV3054G

Количество : 96

Производитель: Orgenium Laboratories (Финляндия)

Методика от 24-09-2009

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор **Orgenium Laboratories' Cytomegalovirus (CMV) IgG Antibody EIA Test** разработан для **полуколичественного и качественного** определения специфических антител класса IgG в сыворотке и плазме к цитомегаловирусу (ЦМВ).

Настоящий анализ предназначен только для диагностического использования in vitro.

Окончательный диагноз должен быть поставлен квалифицированным врачом в контексте клинической истории пациента в сочетании с другими подтверждающими диагностическими методами при их применении.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящее исследование основано на принципе иммуноферментных анализов (ИФА). Очищенный антиген наносится на поверхность лунок микротитрационного планшета. Разбавленные образцы и контроли капают из пипетки в лунки микротитрационного планшета. Происходит закрепление между антителами класса IgG (или ЦСЖ) и иммобилизованным антигеном. После 30-минутной инкубации при 37°C планшет промывается разбавленным промывочным раствором, чтобы удалить несвязанный материал. Впоследствии, конъюгат пероксидазы анти-человеческого IgG добавляется и инкубируется в течение 30 минут при 37°C. После дальнейшей промывки раствора (ТМВ) субстрата капается из пипетки и инкубируется в течение 15 минут при 37°C, стимулируя развитие синего цвета в лунках. Развитие цвета прекращается добавлением стоп-раствора, который изменяет цвет от синего до желтого. Получившийся окрас измеряется спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

Общее время инкубации: **75 минут**.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

- Микролуночный планшет**, 1 шт. : 12x8 лунок
Микротитрационные стрипы, помеченные определенным цветом и кодом, каждая состоящая из 8 лунок, покрытых очищенным антигеном ЦМВ.
Цветовые и текстовые коды указывают исследуемый на стрипе патоген.
- Отрицательный контроль**, 1 флакон
Готовый к использованию.
- Положительный контроль**, 1 флакон
Готовый к использованию.
- Ферментный конъюгат****, 15 мл
Антитела к человеческому IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена, синего цвета. Готовый к использованию.
- Раствор субстрата ТМБ**, 8 мл
Содержит раствор 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Готовый к использованию; потенциально опасен при контакте с кожей; раздражает глаза.
- Стоп-раствор ТМБ**, 8 мл
Содержит раствор 2 N серной кислоты (H₂SO₄)
Готовый к использованию; избегать контакта со стоп-раствором; он может вызвать раздражения кожи и ожоги.
- Разбавитель образцов*****, 120 мл
Готовый к использованию. Зеленого цвета.
- Промывочный буфер – концентрат**, 50 мл 20x концентрированный

После разбавления проверить pH разбавленного промывочного буфера и при необходимости довести его pH до 7,4.

9. **Крышка планшета**, 1 шт.

Крышка для накрывания микротитрационных стрипов во время инкубации.

СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Все компоненты набора, кроме 20x концентрированного промывочного буфера, должны храниться при 2-8°C и использоваться до даты истечения срока годности, указанного на этикетке. Хранить 20x концентрированный промывочный буфер при комнатной температуре.
- В случае образования кристаллов в буфере, просто следует нагревать реактивную бутылку до 37°C, пока кристаллы полностью не растворятся.
- Неиспользованные стрипы должны быть помещены в мешочек, содержащий осушитель и плотно закрыты перед хранением при 2-8°C. После вскрытия стрипы стабильны пока осушитель не станет розовым.
- Разбавленный промывочный раствор может храниться в течение 1 недели при комнатной температуре или 1 месяц при 2-8°C.
- Готовый с использованием фермент, конъюгированный анти-человеческими антителами, сразу после вскрытия стабилен до окончания срока годности на этикетке. Предотвращать от загрязнения. Не возвращать неиспользованную часть конъюгированного ферментом раствор анти-человеческого IgG обратно в бутылку с исходным раствором.
- Все другие жидкие реагенты стабильны если хранить при 2-8°C, при условии, что с ними обращаются внимательно во избежание любого загрязнения окружающей среды. Прежде, чем их выбросить или обработать в автоклаве, они должны рассматриваться как потенциально инфекционные.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Должны использоваться образцы сыворотки или плазмы (ЭДТА, гепарин); соблюдать обычные предосторожности при венепункции. Образец может храниться при 2-8°C до 48 часов, но должен быть заморожен до -20°C или ниже в течение более длительного хранения.
- Необходимо избегать повторного замораживания/размораживания.
- Размороженные образцы должны быть перевернуты несколько раз перед исследованием.
- Не использовать чрезвычайно гемолизированные или липемические образцы.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ МАТЕРИАЛЫ:

- Таймер
- Вихревой смеситель (вортекс)
- Пробирки для разбавления образцов на 2 или 4 мл
- Дозаторы (3, 20, 50, 100, 500 мкл и 1 мл) и многоканальный дозатор (400 мкл)
- Одноразовые наконечники
- Инкубатор, способный к поддержанию 37±2°C
- Дистиллированная вода
- Мерные колбы для подготовки промывочного раствора
- Магнитная мешалка и дополнительная стойка для подготовки промывочного буфера
- Резервуары реагентов для многоканальных дозаторов
- Бумажные полотенца или промокательная бумага
- Микротитрационный ИФА-ридер, способный измерять абсорбцию при 450 нм.
- Микротитрационный планшет-вошер (выборочно).

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

Всем реагентам, образцам и контролям нужно позволить достичь комнатной температуры перед использованием.

1. Образцы сыворотки и плазмы

Перемешать вихревым смесителем и разбавить образцы сыворотки 1:101 готовым к использованию разбавителем сыворотки (например, 10 мкл образца + 1 мл разбавителя образца).

10 мкл сыворотки + 1 мл разбавителя образца

2. Промывочный буфер

Хорошо перемешать и разбавить концентрат промывочного буфера дистиллированной водой 1:20 (например, 50 мл концентрата + 950 мл дистиллированной воды). Если во время хранения в холодном месте образуется осадок кристаллов, концентрат нужно нагревать до 37°C в течение 15 минут. Проверить pH разбавленного промывочного буфера и если необходимо сбалансировать его pH на уровне 7.4. Промывочный буфер стабилен 1 месяц при 2-8°C или в течение 1 недели при комнатной температуре.

50 мл концентрата промывочного буфера + 950 мл дист. воды

ВАЖНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- По крайней мере за 1 час до использования привести все реагенты, набор калибраторов и образцы к комнатной температуре (18-30°C), тщательно их перемешивая вихревым смесителем.
- Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно государственным нормам. Рекомендуется использование контрольных сывороток или плазмы, чтобы обеспечить проверку правильности относительно результатов. Использовать контроли и на нормальных и патологических уровнях.
- Периоды распределения и инкубации должны быть одинаковыми для всех лунок в том же анализе. При ручном проведении анализа использовать многоканальный дозатор.
- Как только анализ начат, все этапы должны быть завершены без прерывания. Используйте новые одноразовые пластмассовые наконечники дозатора для каждого реагента.
- Не позволять реакционным лункам высыхать в течение процедуры анализа. Это может вызвать высокие фоновые помехи в лунках бланка и ошибочные результаты.
- Если Вы не готовы к следующему этапу, или если процедура анализа неожиданно прервана, просто оставьте лунки в промывочном буфере. Однако, не более чем на 5 минут.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Подготовить образцы и разбавленный промывочный буфер** как описано выше.

2. **Определить требуемое количество** 8-луночных стрипов. Настоятельно рекомендуется анализировать каждый образец и контроль в дубле.

Рекомендуемое размещение контролей:

- 2 лунки (например, A1 и B1): для бланка субстрата (100 мкл разбавителя образца)
 - 2 лунки (например, A2 и B2): для отрицательного контроля (100 мкл)
 - 2 лунки (например, A3 и B3): для положительного контроля (100 мкл)
- Остальные лунки используются для образцов пациентов.

3. Закрепить в штативе желаемое количество микротитрационных стрипов и накрыть пленкой для планшета (поставляемой). Возвратить остальные стрипы в мешочек и хранить при 2-8°C.

4. **Раскапать по 100 мкл разбавителя образца, контролей и разбавленных образцов** в соответствующие лунки стрипов.

5. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **30 минут при 37°C**.

6. **Промывка:** Процедура промывки крайне важна и должна проводиться с осторожностью. Неправильная промывка может вызвать неточные результаты, такие как низкая точность и высокий фон. Промывать планшет вручную или используя автоматический планшет-вошер. При ручной промывке энергично вытряхнуть жидкость, и добавить 300 мкл разбавленного промывочного буфера. Освободить лунки, вытряхнув жидкость, чтобы удалить любые ее остатки. Повторить эту процедуру, чтобы в общем количестве составило 4 промывки. По завершении последней промывки перевернуть планшет и постучать о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки и прерывания.

При автоматической промывке произвести аспирацию всех лунок и промыть 4 раза **300 мкл разбавленного промывочного буфера**. Опорожнить лунки, вытряхнув жидкость, для удаления ее остатков. Повторить эту процедуру, что в общем количестве получилось **4 промывки**. После конечной промывки перевернуть планшет и постучать ним о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки или прерывания.

При автоматической промывке произведите аспирацию всех лунок и промойте 4 раза **300 мкл разбавленного промывочного буфера**. Постучать планшетом о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки и прерывания.

7. Добавить последовательно по **100 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку.

8. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **30 минут при 37°C**.

9. **Промывка:** Промыть планшет следуя процедуре в этапе 6.

10. **Быстро раскапать по 50 мкл** раствора ТМВ в промытые лунки.

11. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **15 минут при 37°C**.

12. Остановить реакцию, добавив 25 мкл стоп-раствора ТМВ в каждую лунку. Осторожно встряхнуть и считать при 450 нм в пределах **20 минут** с момента добавления стоп-раствора.

СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

| | | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Разбавленный образец 100 мкл | Ферментный конъюгат 100 мкл | Субстрат ТМВ 50 мкл | Стоп-раствор ТМВ 25 мкл |
| 30 мин. Инкубации при 37°C. | 30 мин. | 15 мин. | Считать планшет |

ЗНАЧЕНИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Перед началом расчета результатов убедитесь, что полученные значения для реагента бланка и контролей находятся в пределах предоставленных в Таблице 1 значений.

Таблица 1: Значения контроля качества

| Образец | Ожидаемый результат |
|------------------------|---|
| Бланк реагент | Значение абсорбции < 0,150 |
| Отрицательный контроль | Значение абсорбции <0,200 *(Отриц. с соотнош. s/co <0,8 |
| Положительный контроль | Положительный (соотнош. s/co ≥1) |

*s/co – абсорбция образца/пороговое значение

Результаты считаются достоверными только если значение абсорбции бланка не превышает 0,150 и значение средней абсорбции отрицательного контроля не превышает 0,200.

РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Расчет ОП порогового значения (cut-off):

$$\text{ОП Cut-off} = \text{константа Cut-off} \times (\text{ОП} \text{ луж. константы} - \text{ОП} \text{ отриц. константы}) *$$

Показатель константы порогового значения см. в Сертификате контроля качества, сопровождающий этот набор. Для точной интерпретации результатов обязательно использовать правильный показатель константы порогового значения.

2. Расчет соотношения s/co:

$$S/CO = \frac{\text{значение ОП образца}^* - \text{ОП отрицательного контроля}}{\text{ОП порогового значения}}$$

*Настоятельно рекомендуется анализировать каждый контроль в дубле. Просьба использовать средние значения абсорбции каждого контроля/образца исходя их формул выше.

3. Схема интерпретации результатов соотношения s/co:

| Соотношение s/co | Интерпретация |
|------------------|----------------------|
| <0,80 | Отрицательный |
| 0,80-0,99 | Сомнительный |
| 1 - 4 | Положительный |
| >4 | Высоко положительный |

4. Диагностическая достоверность результатов

Таблица 2: Диагностическая достоверность и интерпретация результатов.

| | Результаты IgG | Результаты IgM | Интерпретация |
|-----|---------------------------------|----------------|-----------------------|
| ЦМВ | Положительный или отрицательный | Положительный | Острая инфекция |
| | Положительный | Отрицательный | Прошедшая инфекция |
| | Отрицательный | Отрицательный | Антител не обнаружено |

5. Полуколичественный расчет результатов анализа

Вы можете перевести значение ОП Вашего образца в ИФАЕ (иммуноферментные единицы) следующим образом:

$$\text{ИФАЕ} = S/CO \times 25$$

6. Интерпретация образцов острой фазы болезни и выздоравливающих

Для определения сероконверсии необходимо сравнить значения ОП парных образцов и рассчитать следующее:

$$\% \text{ изменения} = \frac{\text{значение ОП 2го образца} - \text{значение ОП 1го образца} \times 100}{\text{Значение ОП 1го образца}}$$

7. Схема интерпретации сероконверсионных результатов

| % изменения в значении ОП | Интерпретация |
|---------------------------|--|
| < 50% | Отсутствие сероконверсии. Отсутствие очевидности недавней инфекции. Рекомендуется сделать забор третьего образца и анализировать параллельно с первым образцом, чтобы наблюдать за значительным увеличением показателя ОП. |
| ≥ 50% | Сероконверсия. В показателе ОП обнаруживается значительное увеличение. Серологический признак острой инфекции (реактивация, повторная инфекция или первичная инфекция, где образец острой фазы был собран слишком поздно, чтобы продемонстрировать сероконверсию). |

Значительное (т.е. ≥ 50%) увеличение абсорбции (ОП) в ИФА при 450 нм в парных сыворотках, собранных в промежутке 8-15 дней указывает на острую инфекцию.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

| Образец | Средняя абсорбция при 450 нм |
|------------------------|------------------------------|
| Реагент бланка | 0,050 |
| Положительный контроль | 1,378 |
| Отрицательный контроль | 0,068 |
| Сыворотка образца | 0,678 |

Пороговое значение ОП = 0,220 (1,378-0,068) = 0,228

(Примечание: показатель константы порогового значения, указанный выше 0,220 является только примером. Правильное значение для настоящего набора см. в Сертификате контроля качества).

$$S/CO = 0,678 - 0,068 / 0,228 = 2,7$$

Значение ИФАЕ образца : 2,7 x 25 = 67 ИФАЕ

Результат образца: положительный

Значение ИФАЕ образца: 67 ИФАЕ

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Всего 65 образцов пациентов использовалось для оценки специфичность, чувствительность и точность анализа. Результаты исследования настоящего набора были сравнены с результатами другого имеющегося в продаже набора ИФА:

| CMV IgG | Reference EIA | | | | |
|--------------|---------------|--------|---|--------|----|
| | N | E | P | Total | |
| Orgenium EIA | N | 30 (D) | 0 | 0 (E) | 30 |
| | E | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | P | 0 (C) | 0 | 35 (A) | 35 |
| | Total | 30 | 0 | 35 | 65 |

N = отрицательный; E = сомнительный; P = положительный Total = всего Reference EIA = референтный ИФА

$$\text{Чувствительность} = A / (A+B) = 35/35 = 100\%$$

$$\text{Специфичность} = D / (C+D) = 30/30 = 100\%$$

$$\text{Точность} = (A+D) / (A+B+C+D) = 65/65 = 100\%$$

| ИФА ЦМВ | IgG |
|--------------------------|---------|
| Точность в анализе | 2 - 7 % |
| Точность между анализами | 2 - 8 % |

| | |
|------------------------------------|--|
| Точность между сериями | 3 - 11 % |
| Перекрестная реактивность | См. ниже* |
| Интерференции | Отсутствует относительно билирубина в концентрации до 0.3 мг/мл, гемоглобина до 8.0 мг/мл и триглицеридов до 5.0 мг/мл |
| **Серологическая специфичность | 100 % |
| ** Серологическая чувствительность | 100 % |

*Были исследованы 35 образцов, которые отрицательны к ЦМВ, но содержат антитела класса IgG к другим вирусам (то есть, краснухе, вирусу Эпштейна-Барра, простому герпесу, кори и паротиту). Наличие этих антител не имело никакого значительного влияния на любые исследования IgG к ЦМВ.

**По сравнению с другим коммерчески доступным набором ИФА IgG ЦМВ.

ВНИМАНИЕ

- Отрицательный результат не исключает текущей или недавней инфекции. Если есть подозрение на острую инфекцию, второй образец сыворотки, полученный 7-14 днями позже, должен быть проверен параллельно, чтобы определить любое увеличение уровня антитела.

- Серологические результаты иммунодепрессивных пациентов должны интерпретироваться с предостережением.

- Результаты исследований, которые получены от единственного серологического образца, не должны использоваться для диагностики недавней инфекции. Соединенные образцы (острый и выздоравливающий) должны исследоваться параллельно, чтобы наблюдать за значительным повышением уровня антител.

- Если требуются сравнения с другими методами, всегда проводят оба исследования одновременно, чтобы предотвратить неожиданные результаты.

- Результаты исследований должны быть оценены в сочетании с информацией, предоставленной клиническим обследованием и другими диагностическими процедурами.

- На эффективность работы компонентов набора не влияет транспортировка при температуре окружающей среды до 5 дней (неофициальные данные).

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Настоящий набор предназначен только для диагностического использования *in vitro* в человеческой сыворотке или плазме квалифицированным и компетентным персоналом, выполняющим диагностические процедуры.

Если получатель настоящего набора передает его любым способом третьему лицу, эта инструкция, должна прилагаться, и вышеуказанный получатель должен под собственную ответственность обеспечить в пользу производителя все ограничения ответственности здесь изложенные.

Компания-производитель не несет ответственности за любые повреждения или потери из-за использования набора в любых случаях кроме тех, которые четко указаны в этой инструкции. Ответственность производителя ни в коем случае не должна превышать коммерческой ценности набора.

Производитель ни в коем случае не несет ответственности за косвенные, умышленные или наследственные повреждения, включая, но не ограничиваясь потерей прибыли.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua