



Vitrotest®

Vitrotest CMV-IgM

Імуноферментна тест-система для якісного визначення антитіл класу IgM до цитомегаловірусу людини

Інструкція з використання

1. Призначення
2. Клінічне значення
3. Принцип аналізу
4. Матеріали та обладнання
5. Застереження та техніка безпеки
6. Зберігання та стабільність
7. Підготовка зразків
8. Підготовка реагентів
9. Процедура аналізу
10. Облік результатів та їх інтерпретація
11. Діагностичні характеристики тесту
12. Обмеження аналізу

Література

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK006

«Vitrotest CMV-IgM»

Імуноферментна тест-система для якісного визначення антитіл класу IgM до цитомегаловірусу людини

1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest CMV-IgM» призначена для якісного визначення антитіл класу IgM до цитомегаловірусу (ЦМВ) у сироватці чи плазмі крові людини.

Тест-набір може бути застосований, як для проведення ІФА з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

2. Клінічне значення

Цитомегаловірусна інфекція (ЦМВІ) – вірусне інфекційне захворювання людини, що перебігає у субклінічних чи клінічних формах з місцевими чи поліорганими ураженнями; рецидиви хвороби обумовлені пожиттєвим переживанням вірусу в інфікованому організмі. У більшості випадків перебіг ЦМВІ безсимптомний, клінічні прояви цитомегаловірусної інфекції спостерігаються за умов імунної недостатності (внаслідок ВІЛ-інфекції, хіміотерапії, імуносупресивної терапії тощо). ЦМВІ у вагітних може призводити до внутрішньоутробного інфікування та формування патології плоду. Тому важливого значення набувають лабораторні методи діагностики ЦМВІ, особливо перед пересадженням органів та на етапі планування вагітності.

При первинному інфікуванні цитомегаловірусом людини через кілька тижнів в крові виявляються специфічні до ЦМВ антитіла класу IgM, які циркулюють у крові протягом кількох тижнів і знижуються повільно через чотири-шість місяців. Анти-ЦМВ специфічні антитіла класу IgG з'являються в крові на тиждень пізніше IgM специфічних антитіл. Антитіла класу IgG зберігаються в крові протягом усього життя. Реактивація інфекції викликає наростання титру антитіл класу IgG, нерідко при цьому підвищується й титр IgM, але не до такого рівня, як при первинному зараженні.

3. Принцип аналізу

Визначення антитіл класу IgM до цитомегаловірусу людини в тест-системі «Vitrotest CMV-IgM» базується на принципі «непрямого» твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА).

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованим в лунках рекомбінантними антигенами цитомегаловірусу pp150 та pp52. Під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування специфічних до ЦМВ антитіл з антигеном на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додається кон'югат специфічних до імуноглобулінів класу IgM людини моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, що зв'язується з імунними комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імунних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). В результаті реакції розчин в лунках де утворились імунні комплекси забарвлюється в синій колір. Реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту, при цьому синій колір забарвлених лунок змінюється на жовтий. Результат аналізу визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620 нм.

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

ІФА-планшет – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок), з іммобілізованими рекомбінантними антигенами ЦМВ pp150 та pp52.

Позитивний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,3 мл розчину імуноглобулінів класу IgM людини специфічних до цитомегаловірусу (рожевий).

Негативний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,5 мл негативної сироватки крові людини (жовтий)

Розчин для розведення сироваток РРС – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину з екстрактом молока, детергентом та консервантами (фіолетовий).

Розчин кон'югату РК – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину моноклональних антитіл до IgM людини, кон'югованих з пероксидазою хрому, із стабілізаторами та консервантом (зелений). Готовий до використання.

Розчин ТМБ – 1 флакон, що містить 12 мл розчину ТМБ і перекису водню з стабілізатором та консервантом (безбарвний).

Розчин для промивання Tr100 (20x) – 1 флакон, що містить 50 мл 20-ти кратного концентрату фосфатного буферу з Тритоном-Х100 (безбарвний).

Стоп-реагент – 1 флакон, що містить 12 мл розчину 0,5 М сірчаної кислоти (безбарвний).

Клейка плівка – 2 аркуші плівки для заклеювання планшетів під час інкубації.

Бланк внесення проб – 1 аркуш для запису схеми внесення зразків.

Інструкція – 1 екземпляр інструкції з використання.

4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

Для постановки аналізу необхідні такі додаткові реактиви, матеріали та обладнання:

- деіонізована або дистильована вода;
 - фільтрувальний папір;
 - мірні циліндри на 10, 200 та 1000 мл;
 - одноразові рукавички;
 - розчин перекису водню 6%;
 - одноразовий або чистий посуд для приготування реактивів (флакони та ванночки);
 - таймер;
 - одно- та багатоканальні автоматичні піпетки змінного об'єму на 20, 200 та 1000 мкл та наконечники до них;
 - термостат на 37°C;
 - контейнер для твердих відходів;
 - контейнер для рідких відходів;
 - ¹автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
 - ²одно- або багатоканальний спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 нм.
- ^{1, 2} *Будь ласка, проконсультуйтеся з нами щодо адаптації Вашого обладнання.*

5. Застереження та техніка безпеки

5.1. Застереження:

- не використовуйте компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;
- не використовуйте під час аналізу та не змішуйте компоненти різних серій та компоненти із тест-систем різних нозологій;

- не використовуйте реактиви інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest™;

Примітка: Розчин для промивання Tr100 (20x), Розчин ТМБ та Стоп-реагент допускається використовувати інших серій, які відрізняються від тих, що вкладені до тест-набору. Ці реактиви використовуються в інших тест-системах виробництва ТОВ „ІВК „Рамінтек”. Будь ласка, проконсультуйтеся з нами для отримання детальної інформації.

- після використання реагенту закривайте кожен флакон своєю кришкою;

- чітко дотримуйтесь режиму промивання планшетів, вказаного в пунктах інструкції;

- під час промивання контролюйте наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;

- кожного разу використовуйте новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;

- уникайте потрапляння прямих сонячних променів на реактиви тест-системи;

- розчин ТМБ має бути безбарвним або світло блакитним перед використанням, якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникайте контакту розчину ТМБ з металами або іонами металів. Для роботи використовуйте лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;

- для внесення в лунки планшета ТМБ-субстрату використовуйте лише нові наконечники, що не були у використанні;

- ні в якому разі не використовуйте один й той же посуд для розчину кон'югату та хромогену.

5.2. Техніка безпеки:

- всі реактиви набору призначені лише для in vitro діагностики;

- постановку аналізу проводити лише у гумових рукавичках;

- не піпетувати розчини ротом;

- контролюйте тест-системи «Vitrotest CMV-IgM» протестовано та знайдено негативними на HBsAg та антитіла до ВІЛ 1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однак працювати із контролями та досліджуваними сироватками слід як із потенційно небезпечним інфекційним матеріалом;

- рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6% упродовж 3 годин при кімнатній температурі, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5% протягом 30 хвилин, або іншими дезінфікуючими агентами;

- тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування при 121°C упродовж 1 години;

- не автоклавайте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;

- слід уникати розбризкування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту із слизовими оболонками та шкірою;

- у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню 6 %-м перекисом водню, а потім витерти насухо фільтрувальним папером.

6. Зберігання та стабільність

Реактиви тест-системи стабільні протягом строку придатності вказаного на етикетці, якщо їх зберігати при 2-8°C.

Транспортувати набір при температурі 2-8°C. Допускається одноразове транспортування при температурі не вище 20°C протягом двох діб.

7. Підготовка зразків

Зразки сироватки чи плазми крові можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 3 діб після забору. Допускається більш тривале зберігання зразків замороженими при температурі від -20 до -70°C. Заморожені зразки перед використанням розморожують та витримують при кімнатній температурі упродовж 30 хвилин. Після розморожування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникайте повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільняються від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./хв. протягом 10-15 хвилин. Не використовуйте зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

8. Підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest CMV-IgM» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.

8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та **зберігайте щільно закритим на замок (zip-lock)** при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Розчин для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.2.

9.4. В лунки стрипів внести по 90 мкл розчину для розведення сироваток.

9.5. Внести в лунки контролі та досліджувані зразки в наступному порядку: в лунку А1 – 10 мкл позитивного контролю, в лунки В1, С1 та D1 – по 10 мкл негативного контролю, в решту лунок – по 10 мкл досліджуваних сироваток. Під час внесення сироваток та контролів обережно піпетуйте суміш – відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з фіолетового на синій.

9.6. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.7. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.8. В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.9. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті 9.7.

9.10. «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником: обережно відібрати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 мкл розчину ТМБ в лунки.

9.11. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25°C.

9.12. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

9.13. Виміряти на рідері оптичну густина в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

10. Облік результатів та їх інтерпретація

10.1. Достовірність результатів аналізу:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$ОГ K_{\text{середнє}} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3})/3.$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

– оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 1,5 оптичних одиниць (ОО),

– ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,2 ОО.

– оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$ОГ K_{\text{середнє}} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{\text{середнє}} \times 2,0.$$

Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення K- за рештою значень негативного контролю.

10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,30, тобто

$$\text{Граничне значення} = ОГ K_{\text{середнє}} + 0,30$$

Для кожного досліджуваного зразка розрахувати індекс позитивності (ІП)

$$ІП = \frac{ОГ \text{ досліджуваного зразка}}{\text{граничне значення}}$$

10.3. Інтерпретація результатів.

Досліджувані зразки із значенням ІП **вище 1,1** вважати **позитивними** (ІП > 1,1).

Зразки із значенням ІП **нижче 0,9** вважати **негативними** (ІП < 0,9)

Зразки із значенням ІП **в межах 0,9-1,1** вважати **невизначеними** (0,9 ≤ ІП ≤ 1,1). Такі сироватки рекомендується дослідити повторно в двох лунках тест-системи. Якщо результати знову будуть в межах невизначених слід провести тестування сироватки, отриманої через 2-4 тижні. В разі одержання невизначених результатів такі зразки вважати негативними.

11. Діагностичні характеристики тесту

11.1. Специфічність та чутливість

Специфічність та чутливість тест-системи «Vitrotest CMV-IgM» оцінювали на комерційній панелі сироваток виробництва „SeraCare Life Sciences” (США) «Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel PTC 202(M)», що складається з 11 охарактеризованих зразків сироваток та плазми крові людини три з яких містять специфічні до ЦМВ антитіла класу IgM. Всі зразки панелі PTC 202 в тест-системі «Vitrotest CMV-IgM» визначались коректно, відповідно до паспортних даних. При дослідженні специфічності тест-набору «Vitrotest CMV-IgM» з використанням 52 сироваток, негативних на антитіла до цитомегаловірусу, всі 52 зразки були виявлені негативними.

11.2. Точність

Відтворюваність результатів в межах однієї постановки аналізу (Intra assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних до ЦМВ антитіл класу IgM оцінювали в 32 повторах на двох серіях тест-систем.

№ сироватки	ІП	CV ₁ , %	CV ₂ , %
1421	1,4	5,9	6,5
2589	5,3	3,7	3,5

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем анти-ЦМВ антитіл класу IgM оцінювали протягом трьох днів в трьох постановках аналізу, по 8 повторів в кожному аналізі.

№ сироватки	ІП	CV, %
1421	1,5	8,7
2589	5,5	6,1

12. Обмеження аналізу

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest CMV-IgM» є свідченням наявності у пацієнта антитіл класу IgM специфічних до цитомегаловірусу людини.

Антитіла класу IgM специфічні до ЦМВ присутні при гострій (активній) цитомегаловірусній інфекції. Не завжди антитіла цього класу є доказом первинної ЦМВІ, при реактивації ЦМВІ також можуть синтезуватись специфічні антитіла класу IgM.

Не можна повністю виключити перехресні реакції з антитілами класу IgM до вірусу Епштейна-Барр, оскільки обидва герпесвіруси мають схожі антигенні детермінанти. Для виключення хибнопозитивного результату рекомендується досліджувати серологічний профіль в динаміці (CMV IgG, CMV IgM, VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgM), а також застосовувати методи виявлення ДНК вірусу в біологічному матеріалі пацієнта та враховувати клінічну картину захворювання.

Література

1. Ершов Ф.И., Касьянова Н.В. Цитомегаловирусная инфекция (современные данные об эпидемиологии, клинике, диагностике и терапии) // Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. – Т.4. – №4.
2. Revello M.G., Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – V.15, No. 4. – P.680-715.
3. Pass R.F. Cytomegalovirus infection // Pediatrics in Reviews. – 2002. – V.23, No. 5. – P.25-29.
4. Plachter B., Weiczorek L., Scholl B.C. et al. Detection of cytomegalovirus antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant polypeptides of large phosphorylated tegument protein pp150 // J. Clin.Microbiol. – 1992. – V.30, No.1. – P. 201-206.
5. Vornhangen R., Plachter B., Hinderer W. et al. Early serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens // J. Clin.Microbiol. – 1994. – V.32, No.4 – P. 981-986.

Умовні позначення

Інтерпретація умовних символів:

	«Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i> »
	«Код партії»
	«Номер за каталогом»
	«Дата виготовлення»
	«Використати до»
	«Температурне обмеження»
	«Містить достатньо для (n-) випробувань»
	«Берегти від прямих сонячних променів»
	«Увага, дивись інструкцію з використання»
	«Виробник»
	«Ознайомлення з інструкціями для застосування»

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



Товариство з обмеженою відповідальністю «Іноваційно-виробнича компанія «Рамінтек»
03039 Україна, м. Київ, пр-т 40-річчя Жовтня, 7, оф. 227 (юридична адреса)
07300 м. Вишгород, Київська обл.. вул. Шолуденка, 19 (фактична адреса)
тел. +380 44 222-76-72

Схема проведення аналізу в тест-системі «Vitrotest CMV-IgM»

Витримати реагенти 30 хв. при 18-25 С

Приготувати розчин для промивання планшета, розвести 20х концентрат розчину для промивання Tr100 очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води

Заповнити бланк внесення проб для аналізу

В лунки планшета внести по 90 мкл розчину для розведення сироваток

Внести по 10 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки:

A1 – позитивний контроль, B1, C1, D1 – негативний контроль,

E1 та решта лунок – досліджувані зразки

Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з фіолетового на синій

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату (зелений)

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату

Інкубувати планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі (18-25°C)

В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту

Виміряти оптичну густину в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм

Розрахувати граничне значення (ГЗ) в тест-системі «Vitrotest CMV-IgM» за формулою:

$$ГЗ = ОГ K_{\text{середнє}} + 0,30$$

Розрахувати індекс позитивності (ІП) для досліджуваних зразків: $ІП = \frac{ОГ \text{ досліджуваного зразка}}{\text{граничне значення}}$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці:

Значення ІП	Результат
$ІП_{\text{зразка}} > 1,1$	позитивний
$0,9 \leq ІП_{\text{зразка}} \leq 1,1$	невизначений
$ІП_{\text{зразка}} < 0,9$	негативний