

**СОДЕРЖАНИЕ**

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	2
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	2
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	6
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	8

---

Инструкция составлена руководителем исследовательского отдела ООО «ХЕМА»,  
к. м. н. Ю.С. Лебединым.

## **ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К ЦМВ В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «ЦМВ IgM-ИФА»**

### **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «ЦМВ IgM-ИФА» предназначен для качественного определения концентрации антител класса IgM к ЦМВ в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) - вирусное инфекционное заболевание человека, протекающее в субклинической и клинической формах с местными или полиорганными поражениями. Рецидивы болезни обусловлены пожизненной персистенцией вируса в инфицированном организме. В большинстве случаев течение ЦМВИ бессимптомно, клинические проявления ЦМВИ наблюдаются в условиях иммунной недостаточности (вследствие ВИЧ-инфекции, химиотерапии, иммуносупрессивной терапии). ЦМВИ у беременных может приводить к внутриутробному инфицированию и формированию патологии плода. Поэтому важное значение имеют лабораторные методы диагностики ЦМВИ, особенно перед пересадкой органов, а также на этапе планирования беременности.

**1.3.** При первичном инфицировании цитомегаловирусом человека через несколько недель в крови выявляются специфические к ЦМВ антитела класса IgM, которые циркулируют в крови на протяжении нескольких недель и медленно снижаются через 4-6 месяцев. Анти-ЦМВ специфические антитела класса IgG появляются в крови на неделю позже IgM специфических антител. Антитела класса IgG сохраняются в крови на протяжении всей жизни. Реактивация инфекции вызывает нарастание титра антител класса IgG, нередко при этом поднимается и титр IgM, но не до такого уровня, как при первичном заражении.

### **2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

Определение антител класса IgM к ЦМВ основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизован рекомбинантный антиген ЦМВ pp150. Антитела из образца связываются с антигеном на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата моноклональных антител к IgM с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител класса IgM к ЦМВ в исследуемом образце. Индекс позитивности (ИП, %) антител класса IgM к ЦМВ в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

### **3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

**3.1. Специфичность и чувствительность.** Набор реагентов «ЦМВ IgM-ИФА» определяет коммерческую панель сывороток Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel PTC202(M) производства Boston Biomedica Company (США) в соответствии с паспортными данными и коррелирует со значениями, полученными на наборе реагентов Abbott EIA CMV-IgM (lot 44423M100). Панель содержит 3 положительных и 8 отрицательных образцов. При исследовании специфичности с использованием 52 сывороток, отрицательных на антитела к ЦМВ на наборах реагентов DiaSorin (Италия) и NovaTec (Германия), все образцы были определены как отрицательные.

**3.2. Воспроизводимость.** Коэффициент вариации результатов определения содержания антител класса IgM к ЦМВ в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ЦМВ IgM-ИФА» не превышает 8,0%.

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на двух сериях набора реагентов «ЦМВ IgM-ИФА» (Intra-assay)

образец, №	кол-во повторов	значение, ОП средняя	CV1, %	CV2, %
1	32	0.504	5.9	6.5
2	32	1.908	3.7	3.5

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на одной серии набора реагентов «ЦМВ IgM-ИФА» в течение трех дней (Inter-assay)

образец, №	кол-во повторов	значение, ОП средняя	CV1, %
1	8	0.54	8.7
2	8	1.98	6.1

## 4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P103MZ	SORB MTP	<b>Планшет</b> 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт	-
2	CN103MZ CP103MZ	CONTROL – CONTROL +	<b>Контрольные сыворотки</b> (отрицательный и положительный контроли) на основе сыворотки крови человека с известным содержанием антител класса IgM к ЦМВ, готовы к использованию (0.5 мл и 0.2 мл соответственно)	2	шт	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
3	T103MXZ	CONJ 11X	<b>Концентрат конъюгата</b> (1.25 мл)	1	шт	прозрачная жидкость ярко-синего цвета
4	ST103MZ	DIL CONJ	<b>Буфер для разведения концентрата конъюгата</b> , готов к использованию (12.5 мл)	1	шт	прозрачная жидкость желтого цвета
5	SP103M	DIL	<b>Буфер для разведения образцов</b> , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость пурпурного цвета
6	R055Z	SUBS TMB	<b>Раствор субстрата тетраметилбензидина</b> (ТМБ), готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
7	S008Z	BUF WASH 21X	<b>Концентрат отмывочного раствора</b> , 21х-кратный (22 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
8	R050Z	STOP	<b>Стоп-реагент</b> , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
9	N003	-	<b>Бумага</b> для заклеивания планшета	2	шт	-
10	K103MIR	-	<b>Инструкция</b> по применению Набора реагентов «ЦМВ IgM-ИФА»	1	шт	-
11	K103MQ	-	<b>Паспорт</b> контроля качества Набора реагентов «ЦМВ IgM-ИФА»	1	шт	-

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**5.1.** Потенциальный риск применения Набора – класс 2Б.

**5.2.** Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

**5.3.** При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

**5.4.** При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;

– термостат, поддерживающий температуру  $+37 \pm 0,1$  °С

– дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 10-250 мкл;

– цилиндр мерный вместимостью 500 мл;

– вода дистиллированная;

– перчатки резиновые или пластиковые;

– бумага фильтровальная.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

**7.1.** Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ( $+18-25$  °С) не менее 30 мин.

### 7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре  $+2-8$  °С в течение всего срока годности Набора.

### 7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

### 7.4. Приготовление конъюгата.

Приготовьте конъюгат: для этого разбавьте концентрат конъюгата в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата. ВНИМАНИЕ! Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки!

Пример: 100 мкл концентрата конъюгата + 1000 мкл буфера для разведения концентрата конъюгата.

**8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

**8.1.** Набор реагентов «ЦМВ IgM-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток

**8.2.** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 46 исследуемых образцов и 2 проб контрольной сыворотки (всего 96 определений).

**8.3.** В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;

- концентрат конъюгата, Буфер для разведения концентрата конъюгата, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;

- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2-8 °С не более 2 месяцев;

- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;

- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 5 суток или при температуре +2-8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

**8.4.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия.

Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

**8.5.** Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

**8.6.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

**9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 4 лунки для контрольных сывороток (Отрицательный контроль 3 лунки, Положительный контроль 1 лунка)
2	<b>Приготовьте конъюгат:</b> для этого разбавьте концентрат конъюгата в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата. <b>ВНИМАНИЕ!</b> Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки! Пример: 100 мкл концентрата конъюгата + 1000 мкл буфера для разведения концентрата конъюгата
3	<b>Внесите во все лунки планшета по 90 мкл буфера для разведения образцов.</b>
4	<b>Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл контрольных сывороток.</b> В остальные лунки внесите в дубликатах <b>по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.</b>

5	<b>ВНИМАНИЕ!</b> При внесении образцов сыворотки (плазмы) крови происходит изменение цвета раствора.
6	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. <b>Инкубируйте планшет в течение 60 минут при температуре +37 °С.</b>
7	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и <b>отмойте лунки 3 раза</b> . При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалить остатки жидкости из лунок.
8	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.</b>
9	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и <b>инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.</b>
10	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и <b>отмойте лунки 5 раз.</b>
11	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензида.</b> Внесение раствора субстрата тетраметилбензида в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. <b>Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 °С) в течение 10-20 минут</b> в зависимости от степени развития синего окрашивания.
12	<b>Внесите во все лунки</b> с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензида, <b>по 100 мкл стоп-реагента</b> , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
13	<b>Измерьте величину оптической плотности (ОП)</b> содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования <b>при длине волны 450 нм</b> . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.
14	<p><b>Рассчитайте содержание антител класса IgM к ЦМВ в исследуемых образцах.</b> Для этого:</p> <p>1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля:  <math display="block">ОП (CN103MZ)_{Cp} = (ОП1 (CN103MZ) + ОП2 (CN103MZ) + ОП3 (CN103MZ)) / 3;</math> Результаты анализа считать достоверными, если  - ОП Положительного контроля не ниже 1.5 оптических единиц (ОЕ)  - ОП Отрицательного контроля не выше 0.15 ОЕ во всех лунках  - ОП каждого значения Отрицательного контроля отличается не более чем в два раза от среднего значения отрицательного контроля, т. е. <math>ОП (CN103MZ)_{Cp} \times 0.5 &lt; ОПn (CN103MZ) &lt; ОП (CN103MZ)_{Cp} \times 2.0</math>  если одно из значений Отрицательного контроля выходит за пределы этого интервала, то его значение не участвует в расчете ОП (CN103MZ)<sub>Cp</sub></p> <p>2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.3  <b>Cut off = ОП (CN103MZ)<sub>Cp</sub> + 0.3</b></p> <p>3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off  <b>ИП = Опобразца / Cut off</b></p>

## 10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

**10.1.** Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

### Интерпретация результатов:

**При ИП > 1.1 образец положительный,**

**при ИП < 0.9 – отрицательный.**

При значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результат в пограничной зоне (+/-).

Такие сыворотки рекомендуется исследовать повторно. Если повторный полученный результат будет неопределенным, то следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными.

## 11. ЛИТЕРАТУРА

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., Gema 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. Vomhagen 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

По вопросам, касающимся качества Набора «ЦМВ IgM-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:  
105043, Москва, а/я 58,  
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)  
электронная почта: info@xema.ru  
интернет: www.xema.ru

Руководитель исследовательского  
отдела ООО «ХЕМА», к. м. н. Ю. С. Лебедин