



## Иммуноферментный анализ для измерения IgM антител к цитомегаловирусу (CMV) в человеческой сыворотке

### CMV IgM Enzyme Immunoassay

Кат. № : 1796  
Количество : 96  
Производитель : DRG (США)

Методика 11-05-2005

### ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ

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

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

1. Разведение образцов 1:40  
5мкл / 200 мкл
2. Три инкубации при 37°С.

Разведенный образец 100 мкл	Ферментный конъюгат 100 мкл	ТМБ реагент (готов к исп-ю) 100 мкл
30 мин.	30 мин.	15мин.

3. Остановить реакцию с помощью 100 мкл кислоты. Считать ОП при 450 нм.

### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

CMV IgM ELISA используется для определения антител IgM к цитомегаловирусу (далее по тексту - CMV)

### ВВЕДЕНИЕ

CMV – это разновидность вируса герпеса а также ведущий биологический фактор, вызывающий врожденные аномалии и осложнения у пациентов, получающих переливание крови и иммуносуппресивную терапию. Около половины беременных женщин, получающих заражение первичной инфекцией передают заболевание плоду. При заражении внутри утробно инфекция может привести к умственной отсталости, слепоте и/или глухоте.

Серологический тест для определения антител к CMV может диагностировать активную или недавнюю инфекцию и дать ценную информацию по истории перенесенной инфекции. Эти тесты также полезны в скрининге крови для переливания новорожденным и реципиентам с ослабленным иммунитетом. CMV IgM ELISA – это точный серологический метод определения IgM антител к CMV для идентификации инфекции цитомегаловируса.

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Очищенный антиген CMV нанесен на поверхность микролунок. Разведенные образцы сыворотки добавляются в лунки, и IgM специфичное антитело CMV, если присутствует, связывается с антигеном. Все несвязанные вещества удаляются при промывке. Добавляется конъюгат пероксидазы хрена, который связывается с комплексом антиген-антитело. Избыточный конъюгат пероксидазы хрена вымывается, после чего добавляется раствор ТМБ реагента. В определенное время каталитическая реакция ферментного конъюгата должна быть остановлена. Интенсивность полученного окрашивания пропорциональна количеству в образце антител CMV специфичных к IgM. Результаты считываются с помощью микропланшетного ридера параллельно с калибратором и контролями.

## РЕАГЕНТЫ

### В состав набора входят:

1. Микротитровальные лунки: покрыты очищенным антигеном CMV (12 x 8 лунок).
2. Ферментный конъюгат (красный): 1 флакон (12 мл).
3. Раствор для разведения образцов (синий): 1 флакон (22 мл).
4. Отрицательный контроль: Диапазон указан на этикетке. Бесцветный колпачок (150 мкл/флакон).
5. Калибратор Cut-off: желтый колпачок. CMV IgM Индекс = 1 (150 мкл/флакон).
6. Положительный контроль: Диапазон указан на этикетке. Красный колпачок (150 мкл/флакон).
7. концентрированный буферный раствор для промывки (20x): 1 флакон (50 мл).
8. ТМБ Реагент (готов к использованию): 1 флакон (11 мл).
9. Стоп-раствор (1N HCl): бесцветный колпачок. 1 флакон (11 мл).

## ХРАНЕНИЕ НАБОРА И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

1. Хранить набор при 2-8°C.
2. Хранить лунки в герметичной упаковке с влагопоглотителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности.
4. Во время использования или хранения не подвергать реагенты набора воздействию тепла, солнца или яркого света.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

### 1. Потенциально биологически опасные вещества:

Калибраторы и контроли содержат компоненты человеческого происхождения, предварительно протестированные и показавшие отсутствие реакции на поверхностные антигены гепатита В, а так же на антитела ВИЧ при взаимодействии с реагентами разрешенными FDA.

Однако, т.к. не существует метода анализа, дающего полную уверенность в отсутствии веществ содержащих ВИЧ или вирус гепатита В, с этими реагентами следует обращаться в соответствии с уровнем безопасности 2, как рекомендуется в Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories." 1984

### 2. Данный набор создан для диагностики «in vitro».

### 3. Не смешивать компоненты из разных лотов.

5. Этот продукт содержит компоненты, хранящиеся с азидом натрия. Азид натрия может вступать в химическую реакцию со свинцом или медью, содержащимися в сантехнике с образованием взрывчатых азидов металлов. После использования смыть большим количеством воды.

## ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

1. Отобрать образцы крови и отделить сыворотку.
2. Образцы можно хранить в холоде при 2-8°C до 7 дней или заморозить на срок до 6 месяцев. Избегать повторного замораживания и размораживания образцов сыворотки.

## ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Все реагенты довести до комнатной температуры (20-25°C) перед использованием.
2. Развести 1 объем промывочного буфера (20x) 19-ю объемами дистиллированной воды. Например, развести 50 мл. промывочного буфера (20x) дистиллированной водой до 1000мл промывочного буфера (1x). Промывочный буфер стабилен в течение 1 месяца при температуре 2-8°C. Хорошо смешать перед использованием.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместить в держатель требуемое количество лунок.
2. Приготовить 1:40 раствор тестовых образцов, отрицательный контроль, положительный контроль, калибратор, добавив 5 мкл образца к 200 мкл раствора для разведения образцов. Хорошо смешать.
3. Раскапать 100 мкл разведенной сыворотки, калибратора и контролей в соответствующие лунки. В лунку 1 А добавить 100 мкл раствора для разведения образцов. Постучать по держателю, чтобы удалить пузырьки из жидкости и хорошо смешать.
4. Инкубировать при 37°C в течение 30 минут.

5. В конце инкубации удалить жидкость из всех лунок. Промыть и вылить содержимое микротитровальных лунок 4 раза разведенным промывочным буферным раствором (1х) и затем 1 раз дистиллированной водой.
6. Раскапать по 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку. Осторожно смешивать в течение 10 секунд.
7. Инкубировать при 37°C в течение 30 минут.
8. В конце инкубации удалить конъюгат из всех лунок. Промыть и вылить содержимое микротитровальных лунок 4 раза разведенным промывочным буферным раствором (1х) и затем 1 раз дистиллированной водой.
9. Раскапать по 100 мкл ТМБ реагента в каждую лунку. Осторожно смешивать в течение 10 секунд.
10. Инкубировать при 37°C в течение 15 минут.
11. Добавить 100 мкл стоп-раствора (1N HCl) чтобы прекратить реакцию.
12. Осторожно смешивать в течение 30 секунд. Важно удостовериться, что синее окрашивание полностью сменяется желтым.

**Примечание: Перед считыванием в лунках не должно быть пузырьков воздуха!** 13. Снимать показания по оптической плотности (ОП) при 450 нм **не позднее чем через 15 минут после окончания икубации** с помощью микротитровального ридера.

## ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Подсчитать среднее значение дубликатов калибратора. ( $x_c$ ).
2. Подсчитать среднее значение дубликатов положительного контроля ( $x_p$ ), отрицательного контроля ( $x_n$ ) и образцов пациентов ( $x_s$ ).
3. Подсчитать коэффициент IgM CMV для каждого определения, разделив средние значения каждого образца ( $x$ ) на среднее значение калибратора, ( $x_c$ ).

**Примечание: значения приведены только в качестве иллюстрации и не должны использоваться для подсчета неизвестных. Каждый пользователь должен получить свои данные.**

1. ОП калибратора cut-off = 0.856, 0.830  $x_c = 0.843$
2. ОП отрицательного контроля = 0.072, 0.071  $x_n = 0.072$   
IgM Коэффициент CMV =  $x_n / x_c = 0.072 / 0.843 = 0.09$
3. ОП положительного контроля = 1.592, 1.641  $x_p = 1.617$   
IgM коэффициент CMV =  $x_p / x_c = 1.592 / 1.641 = 1.92$
4. ОП образца пациента = 1.465, 1.411  $x_s = 1.438$   
IgM коэффициент CMV =  $x_s / x_c = 1.438 / 0.843 = 1.71$

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Анализ проведен правильно, если соблюдались следующие условия:

1. значение ОП бланка реагента по отношению к воздуху микротитровального ридера должно быть менее 0,250.
2. Если значение ОП калибратора Cut-off меньше 0,250 тест необходимо повторить.
3. Коэффициент IgM CMV для отрицательного или положительного контроля должен находиться в пределах, установленных в Сертификате качества.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отрицательный: CMV IgM коэффициент менее 0.90 антитела IgM CMV отсутствуют.

Неясный: CMV IgM коэффициент между 0.91-0.99 - необходимо заново протестировать образец.

Положительный: CMV IgM коэффициент, равный 1.00 или более – наличие антител IgM к CMV.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### I. Специфичность и чувствительность:

образцы 100 пациентов использовались для определения специфичности и чувствительности методики. Результаты анализа CMV IgM ELISA сравнивались с результатами коммерческого ELISA – набора: (См. таблицу на стр. 4 в оригинале инструкции на англ. языке).

Чувствительность =  $A / (A+B) = 51 / 54 = 94.4\%$

Специфичность =  $D / (C+D) = 125 / 132 = 94.7\%$

Точность =  $(A+D) / (A+B+C+D) = 176 / 186 = 94.6\%$

**II. Прецизионность:**

Прецизионность анализа была определена тестированием сывороток трех различных пациентов, в 20 репликатах в разное время. Контрольные значения интра-анализа и интер-анализа приведены ниже:

Образец	1	2	3	4
Интра-анализ	2,7	4,2	4,4	6,4
Интер-анализ	3,9	7,2	7,6	13,5

**ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ**

1. Надежные и соответствующие результаты будут получены при выполнении анализа с полным пониманием инструкции набора в сочетании с хорошей лабораторной практикой.
2. Процедура промывания критически важна. Недостаточная промывка приведет к низкой точности и ошибочно определенным результатам считывания.
3. Образцы сыворотки с большой липемической способностью, гемолизом и мутностью не должны использоваться в анализе.
4. Результаты получены от использования данного набора должны использоваться как дополнительные к другим диагностическим процедурам и к информации располагаемой врачом.

**Информация для заказа:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
Тел.: (0342) 775122  
Факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)