



Иммуноферментный анализ для измерения IgG антител к цитомегаловирусу (CMV) в человеческой сыворотке
CMV IgG Enzyme Immunoassay

Кат. № : 1797
 Количество : 96
 Производитель : DRG (США)

Методика 16-05-2005

ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОЛЬКО В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разведение образцов 1:40
5мкл / 200 мкл
2. Три инкубации при комнатной температуре

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

3. Остановить реакцию с помощью 50 мкл кислоты. Считать ОП при 450 нм.

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

CMV IgG ELISA используется для определения антител IgG 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 иммуносупрессивную терапию. Около половины беременных женщин, получающих заражение первичной инфекцией передают заболевание плоду. При заражении внутриутробно 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 IgG ELISA – это точный серологический метод определения IgG антител к CMV для идентификации инфекции цитомегаловируса.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Очищенный антиген CMV нанесен на поверхность микролунок. Разведенные образцы сыворотки добавляются в лунки, и IgG 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 IgG. 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. Раствор для разведения образцов: 1 флакон (22 мл).
3. Концентрированный буферный раствор для промывки (20x): 1 флакон (50 мл).
4. Раствор А: субстрат - буферный р-р, содержащий H₂O₂ : 1 флакон (12мл)
5. Раствор В: ТМБ Реагент (готов к использованию): 1 флакон (11 мл).
6. Раствор С: Ферментный конъюгат: 1 флакон (12 мл).
7. Калибратор Cut-off, 1,2 МЕ/мл, CMV G Индекс = 1, (желтый колпачок): 150 мкл/флакон,
8. Положительный калибратор, 150 мкл/флакон, 6 МЕ/мл (красный колпачок)
9. Положительный калибратор, 150 мкл/флакон, 18 МЕ/мл (зеленый колпачок)
10. Отрицательный калибратор, 150 мкл/флакон, 0 МЕ/мл (бесцветный колпачок)
11. Отрицательный контроль: 150 мкл/флакон, диапазон указан на этикетке. Синий колпачок
12. Положительный контроль: 150 мкл/флакон, диапазон указан на этикетке. Коричн. колпачок.
13. Стоп-раствор (2N HCl): 1 флакон (10 мл).

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8°C.
2. Хранить лунки в герметичной упаковке с влагопоглотителем.
3. Реагенты стабильны до даты окончания 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.
4. Не пипетировать ртом. Не курить, не есть, не пить в рабочих помещениях.
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 К ИССЛЕДОВАНИЮ

1. Все реагенты довести до комнатной температуры (20-25°C) и хорошо смешать перед использованием.
2. Развести 1 объем промывочного буфера (10x) 9-ю объемами дистиллированной воды до 1 литра. Промывочный буфер стабилен в течение 1 месяца при температуре 2-8°C.

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 по 100 мкл разведенной сыворотки, калибратора и контролей в соответствующие лунки. В лунку 1 А (бланк-реагент)

добавить 100 мкл раствора для разведения образцов. Постучать по держателю, чтобы удалить пузырьки из жидкости и хорошо смешать. Инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут.

4. Удалить жидкость из всех лунок. Промыть и вылить содержимое микротитровальных лунок 5 раз разведенным промывочным буферным раствором.

5. Раскапать по 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку. Инкубировать при при комнатной температуре в течение 30 минут.

6. Удалить конъюгат из всех лунок. Промыть и вылить содержимое микротитровальных лунок 5 раза разведенным промывочным буферным раствором.

7. Раскапать по 100 мкл раствора А и 100 мкл раствора В в каждую лунку. Инкубировать при комнатной температуре в течение 15 минут.

8. Добавить 50 мкл стоп-раствора (2N HCl) чтобы прекратить реакцию.

Примечание: Перед считыванием в лунках не должно быть пузырьков воздуха!

9. Снимать показания по оптической плотности (ОП) при 450 нм с помощью микротитровального ридера.

ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Подсчитать среднее значение дублей калибратора. (x_c).
2. Подсчитать среднее значение дублей положительного контроля, отрицательного контроля и образцов пациентов.
3. Подсчитать коэффициент CMV каждого определения, разделив средние значения каждого образца на среднее значение калибратора, (x_c).

Пример: Коэфф-т CMV G калибратора cut-off = 1,0

1. ОП калибратора (1.2 ед/мл) = 0.845, 0.850 $x_c = 0.848$

2. ОП отрицательного контроля = 0.154, 0.169 $x_n = 0.162$

IgG коэффициент CMV = $x_n / x_c = 0.162 / 0.848 = 0.19$

3. ОП положительного контроля = 1.284, 1.255 $x_p = 1.270$

IgG коэффициент CMV = $x_p / x_c = 1.270 / 0.848 = 1.50$

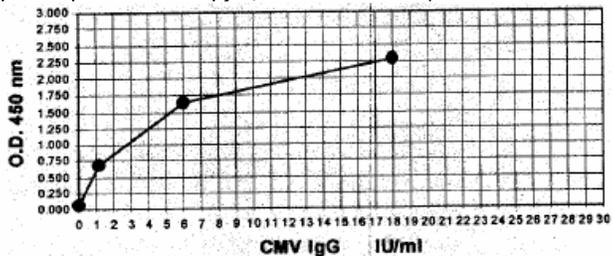
4. ОП образца пациента = 2.392, 2.243 $x_s = 2.318$

IgG коэффициент CMV = $x_s / x_c = 2.318 / 0.848 = 2.73$

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД ПОДСЧЕТА CMV IGG

Для количественной оценки уровня антител к CMV IgG положительных образцов в МЕ/мл, ОП калибратора и положительного контроля откладываются на оси Y на графике против соответствующих концентраций антител к CMV IgG 0, 1.2, 6, 18 МЕ/мл на оси X.

Значения уровней в сыворотках пациентов считываются с графика с помощью индивидуальных значений ОП. Например: (см. таблицы на стр. 4 в оригинале инструкции на англ. языке).



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 меньше 0,250, тест необходимо повторить.
3. Коэффициент IgG CMV для отрицательного или положительного контроля должен находиться в пределах, указанных на этикетках флаконов.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

CMV IgG коэффициент равен или менее 0.90 - отрицательный результат на антитела к CMV IgG (< 1.2 МЕ/мл)

CMV IgG коэффициент между 0.91-0.99 - неясный результат - необходимо заново протестировать образец.

CMV IgG коэффициент, равный 1.00 или более или значение ME более 1.2 - положительный результат: ранее перенесенное заболевание вирусом CMV (>1.2 МЕ/мл)

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

I. Специфичность и чувствительность:

Образцы 85 пациентов использовались для определения специфичности и чувствительности методики. Результаты анализа CMV IgG ELISA сравнивались с результатами коммерческого ELISA - набора: (см. таблицу на стр. 5 в оригинале инструкции на англ. языке).

Чувствительность = $A / (A+B) = 108 / 108 = 100,0\%$

Специфичность = $D / (C+D) = 82 / 84 = 97,6\%$

Точность = $(A+D) / (A+B+C+D) = 190 / 192 = 99,0\%$

II. Прецизионность

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

Образец	1	2	3	4
Интра-анализ	5,1	8,0	2,4	5,1
Интер-анализ	7,6	9,7	5,2	9,9

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

www.diameb.com