



Набор для определения антител класса IgM к цитомегаловирусу (ЦМВ) в сыворотке

Кат. № : 3469
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

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

Методика от 01-2008

1. ВВЕДЕНИЕ

Набор **DRG CMV IgM ELISA** - иммуноферментный набор для количественного и качественного определения антител класса IgM к цитомегаловирусу в сыворотке человека.

Только для диагностического использования *in vitro*

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор **CMV IgM ELISA** это набор для определения антител класса IgM к цитомегаловирусу в сыворотке человека. Образцы сыворотки пациента необходимо развести и немедленно смешать с раствором для разведения IgM образцов, содержащим антитела класса IgG чтобы избежать подавления специфическими IgG и устранить ревматоидный фактор.

Микротитровальные стрипованные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигенами к цитомегаловирусу. **Разведенные** образцы пациента и **готовые к использованию** контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфичные к ЦМВ антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляется пероксидаза хрена конъюгированная антителами IgM. Во время второй инкубации этот конъюгат связывается только с антителами IgM, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями.

После второй промывки (для удаления несвязанного конъюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции.

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgM специфичных к ЦМВ. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA - ридере.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Не существует методов тестирования, полностью гарантирующих отсутствие компонентов вируса Гепатита Б, ВИЧ (HIV/HTLV-III/LAV), или других инфекций. Поэтому все продукты, содержащие компоненты человеческой крови должны рассматриваться как потенциально инфицированные. Следовательно, при работе с ними необходимо соблюдать все меры предосторожности, установленные в лабораторной практике.
- Избегайте контакта кожи со Стоп-раствором – 0,5M H₂SO₄. Это может вызвать раздражения и ожоги
- Немедленно после использования закройте реагенты крышками. Не путайте крышки от реагентов.

- Растворы, содержащие добавки или консерванты, такие как азид соды, не должны использоваться в ферментной реакции.
- Только для диагностики *in vitro*.
- Не используйте в исследовании компоненты из наборов разных партий.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Содержание набора

1. **Микротитровальные лунки**, 12x8 полосок (разламываемые), 96 лунок покрытых антигеном ЦМВ. (включая 1 держатель для полосок и 1 накрываемую фольгу).
2. **Раствор для разведения образцов*****, 1 флакон, 100 мл, готов к употреб., зеленого цвета; pH 7.2 ± 0.2. Содержит анти-человеческие антитела класса IgG.
3. **IgG-RF-сорбент*****, 1 флакон. 6,5 мл Готовый к использованию; желтого цвета. Содержащие анти-человеческие антитела класса IgG.
4. **Стандарт (1-3)*****, 3 флакона 2,0 мл каждый, готов к использованию. Концентрации: 50, 200, 400 Е/мл, желтого цвета, белые колпачки.
5. **Положительный контроль*****, 1 флакон, 1 мл готов к использ., желтого цвета, красный колпачок.
6. **Отрицательный контроль*****, 1 флакон, 2 мл, готов к использ., желтого цвета, желтый колпачок.
7. **Ферментный конъюгат****, 1 флакон, 20 мл готов к употреб., красного цвета, антитела к человеческому IgM, конъюгированные с пероксидазой хрена.
8. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл готов к использ., ТМБ.
9. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл готов к использ., содержит 0,5 моль/л H₂SO₄.

Предупреждение

Серная к-та раздражает глаза и кожу.

10. **Промывочный раствор***, 1 флакон, 30 мл концентрация 20x для 600 мл; pH 7.2 ± 0.2 см. „Подготовка реагентов“.

*⇒ содержит 0.03 % ProClin 300

**⇒ содержит 0.3 % ProClin 300+0.01 % гентамицина сульфата

***⇒ содержит 0.03 % ProClin 300+0.015 % 5-бromo-5-нитро-1.3-диоксан (BND) + 0.010 % 2-метил-2Н-изотиазол-3-один (MIT).

4.1.1 Материалы, необходимые для исследования, но не включенные в набор:

- Микротитровальный планшетный калибровочный ридер (450/620нм +/- 10нм).
- Калибровочные микропипетки разного объема.
- Инкубатор на 37°C.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Вortexный трубочный миксер.
- Таймер.
- Абсорбирующая бумага.

4.2 Хранение и стабильность набора

При температуре хранения от 2 до 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты использовать не рекомендуется.

После восстановления любой раствор стандарта может храниться при 2 – 8 °C в течение 8 дней. При -20°C раствор может храниться значительно дольше.

Конъюгат, субстрат, промывочный буфер и нулевой стандарт должны храниться при 2 – 8°C

Микропланшета должна храниться при 2 – 8°C. После вскрытия фольгированного пакета при хранении пакет необходимо держать плотно закрытым. Иммуноактивность лунок сохраняется приблизительно в течение 6 недель

при хранении во вскрытом, но плотно закрытом пакете с влагопоглотителем.

4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием необходимо довести все реагенты и необходимое количество стрипов до комнатной температуры.

Промывочный раствор

Развести промывочный раствор **1+19** (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистиллированной водой. Потребление: ~5 мл на определение.

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37°C на водяной бане.

Стабильность после разведения: 4 недели при 2 ± 8 °C

4.4 Утилизация набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с официальными государственными правилами. Вся необходимая информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в оригинале инструкции).

4.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Не рекомендуется тестировать поврежденные наборы.

5. ОБРАЗЦЫ

В данном анализе может использоваться сыворотка.

Не использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь стандартным методом венепункции, дать свернуться и отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре.

5.2 Хранение образцов

Образцы должны быть закрытыми, их необходимо хранить до 24 часов при температуре 2-8°C до начала анализа и должны быть заморожены только раз до -20°C для хранения в течении более длительного периода. Размороженные образцы необходимо несколько раз перевернуть перед анализом.

5.3 Разведение образцов

Развести каждый образец пациента **1+100** раствором для разведения образцов, напр., 10 мкл образца + 1 мл раствора для разведения (**хорошо смешать, инкубировать в течении 15 минут, хорошо смешать**).

Внимание: Положительный и отрицательный контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие примечания

Внимательно прочитайте инструкцию перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от четкого следования инструкциям.

- **Перед использованием все реагенты довести до комнатной температуры.** Реагенты необходимо смешать без образования пены.

- Рекомендуется проводить процедуру непрерывно.

- Избегать контаминации реагентов, пипеток, и лунок/пробирок. Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для каждого реагента или образца.

- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, извлечь крышки,

установить лунки в держатель и т.д. Это обеспечит непрерывное проведение каждого этапа пипетирования.

- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре

6.2 Процедура анализа

6.2 Процедура анализа

Перед проведением анализа необходимо разбавить промывочный раствор, **приготовить образцы пациентов как описано в п. 5.3**. Перед пипетированием хорошо перемешайте и составьте **схему распределения и идентификации** с помощью формы вложенной в набор.

1. Отобрать требуемое количество микротитровальных стрипов или лунок и поместить их в держатель.

Разместите по меньшей мере:

1 лунка (напр., A1)	для бланка субстрата
1 лунка (напр., B1)	для отрицательного контроля
3 лунки (напр., C1+E1)	для Стандарта 1 – 3
1 лунка (напр., F1)	для положительного контроля.

На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.

2. Раскапать:

100 мкл	отрицательного контроля в лунку B1
100 мкл	стандарта 1 в лунку C1
100 мкл	стандарта 2 в лунку D1
100 мкл	стандарта 3 в лунку E1
100 мкл	положительного контроля в лунку F1 и

100 мкл **каждого** разведенного образца пациента с **новыми одноразовыми наконечниками** в оставшиеся лунки согласно схеме. Оставить лунку A1 для бланка субстрата!

3. Накрыть лунки пленкой поставляемой в наборе. Инкубировать: **1 час при 37 °C**.

4. Резко встряхните содержимое лунок. Промойте их **5 раз 300 мкл/лунку** рабочего промывочного раствора. В конце осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!

Примечание:

Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.

5. Раскапать **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки **кроме A1** и накрыть их пленкой.

6. Накрыть лунки пленкой. Инкубировать: **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °C)**. Не подвергать воздействию прямого солнечного света!

7. Повторите процедуру промывки как описано в этапе 4. **Примечание:** *осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку!*

8. Раскапать **100 мкл** раствора субстрата **во все** лунки

9. Накрыть и инкубировать: **ровно 10 минут при комнатной температуре (20 ± 25 °C) в темноте**.

10. Остановить ферментную реакцию путем внесения **100 мкл** стоп-раствора **в каждую** лунку. Любое голубое окрашивание проявившееся во время инкубации переходит в желтое.

Примечание: *высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!*

11. Считать оптическую плотность при **450/620 нм** с помощью микротитрационного планшетного ридера в течении **30 минут** после внесения стоп-раствора.

6.3 Измерение

Настроить микропланшетный ридер для ELISA на нуль используя **бланк субстрата в лунке A1**.

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на нуль используя бланк субстрат в лунке A1, вычитайте значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции. Измерить абсорбцию во всех лунках при 450 нм и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в схему.

Двойная длина волны – рекомендуется считывать на 620 нм как референтной длине волны. Где применимо рассчитать среднее значение абсорбции всех дублей.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Надежность процесса анализа

Постановка анализа может считаться **действительной** при соблюдении следующих условий:

- **Бланк субстрата в А1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.100**.
- **Отриц. контроль в В1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.200**.
- **Стандарт 1 в С1:** ⇒ значение абсорбции между **0.300 - 0.600**.
- **Стандарт 2 в D1:** ⇒ значение абсорбции между **0.900 - 1.700**.
- **Стандарт 3 в E1:** ⇒ значение абсорбции выше **1.300**.
- **Полож. контроль в F1:** ⇒ значение абсорбции более **1.00**.

ПРИМЕЧАНИЕ:

В случае если эти критерии для стандартов 1 – 3 не соблюдены, процедура теста считается недействительной. **Необходимо провести процедуру снова.** Вместе со стандартами 1 – 3 необходимо включать в процедуру анализа полож. контроль.

7.2 Вычисление количественных результатов

Для получения **количественный результат в МЕ/мл** необходимо вывести (средние) значения абсорбций отрицательного и стандартов 1,2,3 на (миллиметровой) бумаге в системе координат напротив их соответствующих концентраций (0, 10, 50 и 100 МЕ/мл) и начертите стандартную калибровочную кривую абсорбции на оси Y, концентрации на оси X.

Считайте результаты из стандартной кривой, используя (средние) значения абсорбции каждого образца пациента и контроля. Могут быть использованы соответствующие компьютерные программы для считывания и вычисления. Могут быть использованы следующие математические функции: лнейная регрессия, вычисления от точки к точке стандартной кривой.

7.2 Интерпретация количественных результатов

Диапазоны значений в норме для данного набора должны определяться каждой лабораторией самостоятельно, основываясь на данных пациентов обслуживаемой территории. Необходимо принять во внимание и руководствоваться следующими значениями.:

Положительный: > 65 МЕ/мл
Серая зона: 40 – 45 МЕ/мл
Отрицательный: < 45 МЕ/мл

7.4 Важные замечания по интерпретации результатов набора

Если есть подозрение на инфекцию краснухи во время беременности, необходимо определить состояние антител беременной женщины. В случае обнаружения в сыворотке 65 МЕ/мл IgG или выше означает, что женщина защищена от инфекции и риск повреждения эмбриона отсутствует.

В «серой зоне»
 ⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

средние значения абсорбции пациента
 ниже СО
 ⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствие с нормами федеральных и государственных прав. Использование контрольных образцов обеспечивает достоверность результатов анализа. Используйте контроли на нормальном и патологическом уровнях.

Контроли и соответствующие результаты Лаборатории контроля качества указаны в сертификате контроля качества, который прилагается к набору. Значения и диапазоны, указанные в сертификате контроля качества всегда соответствуют данному лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Так же рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для обеспечения точных результатов анализа.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и отклонений. Если результаты анализа не соответствуют установленным допустимым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента необходимо рассматривать как недействительные. В этом случае, проверьте следующие технические данные: приборы для пипетирования, фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирационные и промывочные методы. В случае проверки всех выше перечисленных пунктов вы не обнаружили никаких неисправностей, обратитесь к вашему дистрибьютору или же непосредственно в компанию DRG.

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

1.3 Определение качественных результатов

Значение абсорбции **Стандарта 1** (cut-off) = СО

Пример: 0,50 = СО

1.4 Интерпретация качественных результатов

Средние значения абсорбции образцов пациента
 более чем на **20 % выше СО**
 ⇒ **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

(Средние) значения абсорбции пациентов
 от СО до до **20 % выше СО**
 ⇒ **серая зона** ⇒ **повторить анализ**

2 - 4 недели спустя – на новых пробах пациентов

результат второго анализа опять