



Иммуноферментный набор для определения avidности IgG антител анти-ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА в человеческой сыворотке или плазме

Кат. № : K3CGA
Количество тестов: 45
Производитель : Radim (Италия)

*Методика от 02-2006
Версия 8*

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

ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОЛЬКО В ДИАГНОСТИКЕ IN VITRO

1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Цитомегаловирус (ЦМВ) - вирус двадцатигранной формы, 180-250 нм в диаметре, принадлежащий к семейству герпесных вирусов. Вирус имеет цитопатологический эффект, связанный с увеличением клеток-хозяинов и есть доказательством эндоплазматических, а также ядерных включений. В настоящее время ЦМВ рассматривается как наиболее частая причина врожденных аномалий из-за внутриматочных инфекционных болезней. Приблизительно 2 % беременных женщин имеют отношение к первой или повторной инфекции, в то время как 10-20% новорожденных младенцев с врожденными инфекциями ЦМВ демонстрируют значительные повреждения центральной системы. Повреждение плода – теперь считается главным образом причиной первичной инфекции более чем повторной инфекции. ЦМВ - также важная причина осложнений в трансплантации органов, особенно в трансплантации почек. В этих случаях первичная инфекция более вредная, чем повторная инфекция.

Диагностика недавно приобретенной первичной инфекции посредством специфических IgM антител может быть затруднительной исходя из наличия IgM даже в повторяющихся инфекционных болезнях. Кроме того, распространение IgM антител может сохраняться в течение долгих месяцев и даже в течение двух лет в иммунодепрессивных лицах. Измерение avidности специфического IgG оказалось особенно полезным при определении первичной инфекции. Фактически, начальный гуморальный иммунный ответ IgG на инфекцию характерен для антител с низкой avidностью, в которой связывание с местами специфического антигена легко разъединяется.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Этот набор основан на методе ферментного иммунологического анализа (ELISA), в котором сыворотке пациента реагирует в дубликате с антигеном ЦМВ, покрытым на микропланшете. После первой инкубации, сопровождаемой промывкой микропланшета, лунка репликаторов инкубируются, каждая с отдельным буферным раствором, один из которых содержит мочевины. Реагент мочевины причиняет разъединение предварительно сформированного закрепления антитела-антигена. Степень диссоциации зависит от avidности данного антитела. Далее после этапа промывки, антитела, которые все еще закреплены к твердой фазе, проявятся в последующих реакциях, сначала с анти-человеческим IgG антителом (соединенный с пероксидазой хрена и затем с хромогенным раствором (тетраметилбензидина, ТМВ) в субстратном буфере. Колориметрическое считывание будет проводится при использовании спектрофотометра на 450 и 405 нм. Затем рассчитывается соотношение между оптическими плотностями двух лунок и выражается как процент avidности.

3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок, что соответствует 45 анализам.
- хранить набор при 2-8°C.
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 2 месяцев.

3.1 Специфические реагенты

- **Покрытый микропланшет:** 1 планшет на 96 делимых лунок покрытых вирусным антигеном ЦМВ. Держите неиспользованные лунки при 2-8°C в поставляемом полиэтиленовом пакете (контейнере микропланшета) тщательно закрытым.
- **Контроль низкой avidности:** 1 флакон основы сыворотки с анти-ЦМВ IgG человека низкой avidности. Лиофилизированный, красного цвета. Консервант: NaN_3 (<0.1%). Перед использованием разбавить содержимое флакона 2 мл дистиллированной воды. После разбавления хранить при 2-8°C в течении 2 месяцев; при более длительном хранении заморозить до -20°C.
- **Контроль высокой avidности:** 1 флакон основы сыворотки с анти-ЦМВ IgG человека высокой avidности. Лиофилизированный, синего цвета. Консервант: NaN_3 (<0.1%). Перед использованием разбавить содержимое флакона 2 мл дистиллированной воды. После разбавления хранить при 2-8°C в течении 2 месяцев; при более длительном хранении заморозить до -20°C.
- **Диссоциирующий реагент:** 1 флакон (10 мл) мочевины в буферном растворе. Готов к использованию.
- **Ферментный конъюгат:** 1 флакон (14 мл) мышиноного моноклонального анти-человеческого IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена в матрикс сыворотки со стабилизаторами. Розового цвета, готов к использованию. Консервант: неомидин.

3.2 Общие реагенты для наборов панелей T.O.R.C.H –S.T.D. и детских болезней

- **Промывочный раствор (концентрированный):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween 20. Консервант: тимеросал (< 0.05 %). Непосредственно перед использованием, разбавьте необходимое количество 1:20 дистиллированной водой. Хранить разбавленный промывочный раствор в течение 30 дней при 2-8°C. В случае нерастворенных кристаллов, заново суспендируйте раствор, оставив флакон на несколько минут при 37°C.
- **Разбавитель образца:** 1 флакон (20 мл) основы сыворотки со стабилизаторами, красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Непосредственно перед использованием, разбавьте необходимое количество 1:20 предварительно разбавленным промывочным раствором. Хранить разбавленный разбавитель образца в течение 30 дней при 2-8°C.
- **Хромоген ТМВ:** 2 флакона (по 15 мл) тетраметилбензидина с цитратно-фосфатным буфером DMSO и H_2O_2 . Готов к использованию.
- **Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H_2SO_4 . Готов к использованию.
- **Липкие пленки для планшета.**
- **Полиэтиленовый пакет.**

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Инкубатор, настроенный на 37+/-2 °C.
- Мерные колбы для разбавления образцов.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр для измерения абсорбций с интервалом 0-3,0 А при 450 и 405 нм.
- Миллиметровая графическая бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводится на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ЗАМЕЧАНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфичные реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
 - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
 - периодам инкубации и температуре, это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходит регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелюбопытная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/- 2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-НСV.

Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.

- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.
- Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Во избежание накопления взрывоопасных азидов металла в медных и свинцовых трубопроводах реагенты необходимо удалять путем промывания водосточной трубы большим количеством воды.

6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко липемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Образцы плазмы могут содержать волокнистые вещества, которые могут повлиять на анализ; перед анализом убедитесь, что образцы всегда идеально чистые. Храните образцы при 2-8°C в течении 1-2 дней. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы до -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов.

Перед использованием разбавьте образцы 1:300 разведенным разбавителем образца (см. РЕАГЕНТЫ).

Пример: 10 мкл образца + 2990 мкл разведенного разбавителя образца).

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Позвольте реагентам и образцам нагреться до комнатной температуры.
- Переверачивая образцы, смешайте их перед использованием.
- 7.1 Приготовьте лунки в двойном экземпляре для: бланка, контроля низкой avidности, контроля высокой avidности и образцов.
- 7.2 Внесите **100 мкл** контроля низкой avidности в лунки C1 и D1; **100 мкл** контроля высокой avidности в лунки E1 и F1; **100 мкл** первого (разбавленного) образца в лунки G1 и H1; аналогично продолжайте со всеми другими образцами.
- 7.3 Накройте микропланшет самоклеющейся крышкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **60 +/- 5 минут при 37 +/- 2°C**.
- 7.4 Соберите инкубационную смесь и промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
- 7.5 Внесите **100 мкл** разбавителя образца в непарные лунки (A1, C1, E1, G1 и т.д.) и **100 мкл** диссоциирующего реагента в парные лунки (B1, D1, F1, H1 и т.д.).
- 7.6 Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **30 +/- 2 минут при 37 +/- 2°C**.
- 7.7 Соберите жидкость и промойте лунки как описано в п. 7.4.
- 7.8 Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки.
- 7.9 Накройте микропланшет самоклеющейся крышкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **30 +/- 2 минут при 37 +/- 2°C**.
- 7.10 Соберите жидкость и промойте лунки как описано в п. 7.4.
- 7.11 Внесите **100 мкл** хромогена во все лунки.
- 7.12 Инкубируйте лунки в течении **10 минут при 37 +/- 2°C**.
- 7.13 Внесите **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
- 7.14 Считайте абсорбцию лунок желателью с помощью бихроматичного спектрофотометра при **450 нм** с контрольной длиной волны 620 нм (настроив аппарат на 0 с лункой бланка). В случае избытка значений абсорбции считайте при 405 нм. Считывание должно быть завершено в течении **15 минут** после завершения анализа.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 4 данной инструкции).

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ*

9.a Отнимите значение бланка (средняя ОП лунок A1 и B1) от значений всех остальных лунок.

9.b При использовании каждого образца убедитесь, что ОП лунок инкубируемых с разбавителем образца - > 0,300. Если так, можете продолжать. Если нет, образец не достаточно концентрирован для оценки avidности IgG (пациенты отрицательны к инфекции ЦМВ или

пациенты инфицированы, но реакция антител пока что слишком слабая).

9.c Для каждого образца и контроля вычислите процентное соотношение между ОП лунки, обработанной диссоциирующим реагентом и ОП лунки, обработанной разбавителем образца. Это соотношение будет составлять процент avidности образца/контроля.

ОП с диссоц. реагентом $\times 100 = \% \text{ avidности}$
ОП с разбавителем образца

9.d Образцы с ОП >3.000 при 450 нм в любой лунке необходимо считать при 405 нм. В таких случаях необходимо вычислить процент avidности, основываясь на считывании в п. 9.c.

* Используя автоматический аппарат для микропланшетов RADIM и/или SEAC, спектрофотометрическое считывание будет выполняться автоматически при 3 различных волнах длины: 450, 405 и 620 нм, таким образом, позволяя расширить диапазон кривой.

9.1 Пример вычисления

Образец	ОП с разбавит. образца	ОП с диссоц. реагентом	% avidности
Контр. низк. avidности	0,947	0,178	18,8
Контр. высок. avidности	1,244	0,972	78,1
Образец	0,265	0,080	14,1

9.2 Критерии достоверности

ОП при 450 нм контроля и низкой и высокой avidности в лунках, обработанных разбавителем образца должна быть более чем 0,500. Процент avidности (вычисленный выше) должен быть меньше 35% для контроля низкой avidности и более 45% для контроля высокой avidности. В любом случае, результаты должны основываться на клинической оценке и дальнейших диагностических исследованиях.

9.3 Интерпретация результатов

% avidности > 45% =	IgG анти-ЦМВ с высокой avidностью
% avidности 35-45% =	IgG анти-ЦМВ со средней avidностью (серая зона)
% avidности < 35% =	IgG анти-ЦМВ с низкой avidностью

10. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНАЛИЗА

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность метода была оценена на группе из 118 образцов с прошлой или вторичной инфекцией. Результат составил 97.4 %.

10.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность метода была оценена на группе из 33 образцов с первичной инфекцией. Результат составил 93.9 %.

10.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность может быть определена как способность анализа точно обнаруживать определенный аналит в присутствии потенциально интерферирующие факторы в матрице образца. Контролируемые изучения потенциально интерферирующих материй показали, что на эффективность анализа не воздействуют антикоагулянты (ЭДТА и гепарин).

10.5 Точность

Точность была оценена на приборе Radim, определяющем повторяемость и воспроизводимость анализа (вариативность в пределах и между анализами) на 3 сыворотках при разном % avidности.

Повторяемость (в пределах анализа)

Сыворотка	Средн.	\pm (Avidность, %)	CO	KB	Репликации, к-во
a	11.5		0.8	7.1	10
b	53.2		3.6	6.7	10
c	82.9		2.1	2.5	10

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн.	\pm (Avidность, %)	CO	KB	Репликации, к-во
d	11.5		2.98	26.7	10
e	18.44		2.26	12.3	10
f	76.39		10.64	13.9	10

11. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результат с высокой avidностью не исключает возможности недавней инфекции. С другой стороны, при высокой специфичности анализа положительный результат строго указывает на инфекцию в течении предыдущих 3 месяцев.

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

8. СХЕМА АНАЛИЗА

Лунки Реаг.	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
К. низк. avidности	—	—	100 мкл	100 мкл	—	—	—	—
К. высок. avidности	—	—	—	—	100 мкл	100 мкл	—	—
Образец	—	—	—	—	—	—	100 мкл	100 мкл

- Инкубировать: 37±2°С, 60±5 мин.
- Аспирировать и промыть: 4 x 350 мкл

Разбав. образца	100 мкл	—						
Диссоц. реагент	—	100 мкл						

- Инкубировать: 37±2°С, 30±2 мин.
- Аспирировать и промыть: 4 x 350 мкл

Конъюгат	100 мкл							
----------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубировать: 37±2°С, 30±2 мин.
- Аспирировать и промыть: 4 x 350 мкл

Хромоген ТМВ	100 мкл							
--------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубировать: 37±2°С, 10 мин.

Блок. реагент	100 мкл							
---------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Считать: 450-405 нм.