

CMV IgG тест ПКС

Иммунно - ферментный метод с Системой Контроля Пипетирования (ПКС), для количественного определения IgG - антител к вирусу Cytomegalie.

Номер по каталогу: 115/Q/PKS

Для диагностики in vitro

Введение

Цитомегаловирус (далее CMV) относится к группе патогенных герпесных вирусов человека. Типичным для этих вирусов является то, что они после первичной инфекции могут присутствовать в организме в скрытой форме. Это может привести к реактивации вируса после первичной инфекции. CMV- инфекции у пациентов с достаточным иммунитетом протекают как правило незаметно. У пациентов с пониженным иммунитетом (например после трансплантации, ВИЧ - инфицированные или новорожденные) можно наблюдать тяжелые симптомы различного рода. В зависимости от иммунитета матери инфекция до родов может протекать бессимптомно. Наличие у матери IgG - антитела в большинстве случаев предотвращает инфекцию у плода. У матерей с отрицательной сывороткой может возникнуть инфекция, которая в тяжелых случаях может протекать вместе с гепатоспленомегалией, пневмонией, тромбоцитопенической пурпурой, а также микроцефалией. В зависимости от географического региона и зараженности у 50 - 100 % взрослых обнаруживаются IgG - антитела к CMV. Тест находит применение при перепроверке уровня иммунитета пациентов с клиническим подозрением на инфекцию CMV (например пациенты с ограниченным иммунитетом). Особое внимание уделяется обследованию на CMV при обследовании доноров, так как перенос CMV через кровь или через трансплантированный орган может иметь тяжелые последствия (например реакцию отторжения).

Кроме CMV - IgG - ELA тест PKS (96 тестов)

Кат. № 115/PKS

предлагаются:

CMV - IgG - ELA тест PKS (5 x 96 тестов) Кат. № 116/PKS

CMV - IgA - ELA тест PKS (96 тестов) Кат. № 112/PKS

CMV IgM - ELA тест PKS (96 тестов) Кат. № 110/PKS

Принцип теста (см. Стр. 15 оригинала)

Микропланшета покрыта CMV – антигеном.

Антителам к CMV в сыворотке пациентов селективно связываются с антигеном.

Конъюгированные пероксидазой античеловеческие IgG антитела связываются с IgG антителами.

Инкубация с ТМВ - субстратом. Остановка реакции стоп раствором. Считывание осуществляется фотометрически.

Преимущества теста

- Система контроля пипетирования дает возможность проверить каждый; отдельный шаг пипетирования посредством изменения цвета;
- "Разламывающиеся" стрипы позволяют более эффективно использовать набор.
- Подходит для автоматов с открытой системой;
- Расчет по одной точке, не требуется стандартная кривая;
- Не требуется дополнительная калибровочная кривая для диагностики Спинальной жидкости.

Содержимое упаковки:

Кат.№ 115/Q/PKS

1. Микропланшета: 12 стрипов ("разламывающиеся") по 8 лунок в рамке, маркированы оранжевым, (с влагопоглощающей прокладкой) покрыта CMV антигеном и pH - индикатором, готова к употреблению.
2. Отрицательный контроль: 1 флакон 1,5 мл., человеческая сыворотка, готов к употреблению, содержит фенол, ProClin 300 и гентамицина сульфат.
3. Положительный контроль: 1 флакон 1,5 мл., человеческая сыворотка, готов к употреблению, содержит фенол, ProClin 300 и гентамицина сульфат
4. Калибратор: 1 флакон 1,5 мл., человеческая сыворотка, готов к употреблению, содержит фенол, ProClin 300 и гентамицина сульфат
5. Концентрат промывочного буфера: 1 флакон 100 мл. 10-тичной концентрации, PBS/Tween, pH 7.2-7.4, содержит 0,5 % ProClin 300
6. Буфер разведения проб: 1 флакон 110 мл, PBS/Tween/BSA, pH 7.2-7.4, готов к использованию, содержит 0,5 % ProClin 300
7. Конъюгат: 3 флакона по 4,5 мл. каждый, козий анти-человеческий Ig G, готовый к использованию, окрашен зеленым, HRP- конъюгирован, содержит БСА, фенол, ProClin 300 и гентамицина сульфат
8. ТМВ - субстрат: 1 флакон 10 мл, готов к употреблению.
9. Стоп-раствор: 2 флакона по 11 мл, готов к использованию.

1. Хранение и стабильность

Материал/реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Тест - упаковка	не открытая	2...8 C	до истечения срока годности
Микропланшета	открытая	В пакете с влагопоглощающей прокладкой 2...8 C	6 недель
Конъюгат	открытый	2...8 C	6 недель
Контроли, калибратор	открытые	2...8 C	6 недель
Отмывающий буфер (с. 3.1.)	разведенный	2...8 C	6 недель
Буфер для образцов	открытый	2...8 C	6 недель
Стоп-раствор	открытый	2...8 C	до истечения срока годности
ТМВ субстрат	открытый	2...8 C	6 недель

2. Дополнительно необходимые реагенты и материалы

Med 115-Q-PKS-VPDEF/260308

- 2.1. H₂O (бидистиллированная вода). Использование деионизированной H₂O может привести к ошибкам при проведении теста.
- 2.2. Многоканальные и одноканальные пипетки с переменным объемом (10 - 100 мкл; 100 - 1000 мкл;)
- 2.3. Приспособление для отмывки планшет (мультистеппер или вошер)
- 2.4. Чистый стеклянный или пластиковый сосуд для приготовления отмывающего буфера и образцов.
- 2.5 Инкубатор на 37 С.
- 2.6. Микроплащечный ридер (фотометр) с фильтрами для 450 нм и 620-650 нм.

3. Подготовка реагентов

До начала проведения исследований все компоненты тест-системы должны быть выдержаны при комнатной температуре

Расчитайте необходимое количество микротитровых стрипов.

3.1.Моющий буфер (= 10 мл/стрип-8 лунок)

1 часть концентрата буфера используется с 9 частями воды для инъекций (например 50 мл буферного концентрата с 450 мл воды для инъекций). Кристаллы, образующиеся при хранении концентрата, растворяются при нагревании до 37 С и/или перемешиванием при комнатной температуре.

Не смешивать реагенты из различных лотов или производителей.

Правильные и воспроизводимые результаты могут получаться только при использовании оригинальных реактивов.

3.2. Использование микропланшеты.

Перед каждым вскрытием алюминиевого пакета микропланшеты должны достичь комнатной температуры, чтобы избежать возникновения конденсата. Оставшиеся не использованными микротитровые планшеты могут храниться в течение 8 недель при температуре 2.....8 С, закрытыми в пакет с влагопоглощающей прокладкой. После каждого изъятия стрипов алюминиевый пакет должен плотно закрываться.

Примечание: микропланшеты окрашены в слегка зеленый оттенок. Появление зеленовато-коричневого окрашивания не оказывает влияния на результаты теста.

4. Исследуемый материал

- 4.1. Может использоваться сыворотка, плазма или спинномозговая жидкость (см. раздел 8 оригинальной инструкции).
- 4.2. Предварительная обработка крови, например, инактивация, не требуется. Однако, пробы не должны содержать эритроциты и микроорганизмы.
- 4.3 Сыворотка или плазма должны быть разведены 1 : 200 Буфером разведения образцов. Мы рекомендуем разводить следующим образом: начальное разведение 1 : 50 (10 мкл сыворотки + 490 мкл Буфера для разведения проб), затем берется 20 мкл разведенной пробы + 60 мкл Буфера для разведения проб (1 : 4). Образцы , у которых значение превышает разрешенный предел, разводятся дополнительно.

5А. Постановка теста

5.1. Упаковку микропланшеты вскрыть по линии вскрытия и взять необходимое количество стрипов (с. 3.1.). **Стрипы готовы к употреблению и не нуждаются в предварительной отмывке.**

5.2. Лунка А1 остается свободной для установки бланка (см. 6А). Раскапать 50 мкл разведенных проб пациентов, и отрицательные и положительные контроли и калибратор в дубле в лунки планшета. Планшета может храниться во влажной камере 30 минут при комнатной температуре (18 - 25 С) или 60 минут при температуре 2.....8 С до дальнейшей обработки.

После раскапывания проб (рН - нейтральные или щелочные жидкости) происходит окраска в голубой цвет. Если в лунке не происходит окраски, то это указывает на то, что сыворотка или контроли не были раскапаны.

5.3 Инкубировать стрипы 60 мин (± 2 мин) при 37 С (±1 С) во влажной камере или предварительно запечатать планшету специальной лентой.

5.4. После инкубации промыть стрипы три раза с 200 мкл отмывающего буфера. Следить за тем, чтобы все лунки при промывке были заполнены. После окончания процесса отмывки вытряхнуть стрипы на фильтровальную бумагу.

Не давать высохнуть! Немедленно использовать!

5.5 В каждую лунку (исключая А1) добавить 50 мкл Конъюгата (окрашен зеленым).

При ручной постановке теста необходимо раскапать по 50 мкл конъюгата.

Если тест проводится на полном автомате - необходимо раскапать по 60 мкл конъюгата, что обусловлено повышенным испарением в инкубационной камере.

5.6. Инкубировать в течение 60 минут (± 5 минуты) при 37 С во влажной камере или предварительно запечатать планшету специальной лентой.

5.7 После завершения инкубации промыть палочку снова (см. 5.4).

5.8 Добавить по 50 мкл ТМВ-субстрата в **каждую** лунку (включая А1) и инкубировать 30 мин (± 2 мин) при 37 С (± 1 С) во влажной камере или запечатать палочку специальной лентой в темноте. Положительные образцы будут голубыми.

5.9. Добавлением 100 мкл Стоп-раствора в **каждую** лунку (включая А1) реакция останавливается. Происходит смена окраски с голубого на желтый.

Перед фотометрическим считыванием протрите наружную поверхность дна лунок мягкой тканью и убедитесь, что в лунках отсутствуют пузырьки воздуха.

Фотометрическое считывание необходимо произвести в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

5Б. Таблица рабочей процедуры.

	Бланк (А1)	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Калибратор	Пробы
Отрицательный контроль	-	50 мкл.	-	-	-
Положительный контроль	-	-	50 мкл	-	-
Калибратор	-	-	-	50 мкл	-
Пробы пациентов	-	-	-	-	50 мкл.
Инкубация 60 мин при 37 С, затем промывка 3 раза по 200 мкл/лунка					
Конъюгат	-	50/60 мкл	50/60 мкл	50/60 мкл	50/60 мкл
Инкубация 60 мин при 37 С, затем промывка 3 раза по 200 мкл/лунка					
ТМВ-Субстратный раствор	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Инкубировать в течение 30 минут при 37 С в темноте.					
Стоп - раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	50 мкл
Фотометрическое считывание при 450 нм (референс 620-650 нм.)					

Примечание: при использовании автоматического иммуноферментного анализатора добавляется по 60 мкл в лунку.

6А. Оценка теста (Валидность)

Фотометрическое считывание происходит при длине волны 450 нм (620-650 нм в качестве референса). Значение ОП фона (лунка А1) отнимается от всех значений ОП.

Лот-специфичные данные: Лот-специфичная калибровочная кривая, параметры калибровочной кривой a,b,c., номинальное значение ОП калибратора, нижний предел ОП калибратора, номинальный интервал концентрации Положительного контроля.

Критерии оценки теста (валидности):

- среднее значение ОП **Отрицательного контроля** должно быть < **0.150**
- единичное значение **Положительного контроля** должна быть в интервале номинального значения для этого лота.
- среднее значение ОП **Калибратора** должно быть выше нижнего предела ОП установленного для этого лота.

Повторите исследование, если полученные результаты оценки не совпадают с контрольными.

Корректировка результатов:

Измеренное значения Положительного контроля и проб корректируют (подправляют) следующим образом:

$$\text{ОП кор.} = \frac{\text{полученное значение Калибратора}}{\text{номинальное значение Калибратора}} \times \text{ОП измеренная}$$

Количественное вычисление результатов измерений:

Конкретные значения концентраций могут быть вычислены с использованием лот-специфической калибровочной кривой, находящейся в каждом наборе или вычислены по следующей формуле:

$$\text{Концентрация в пробе (AU/ml)} = b / \left(\frac{a}{\text{ОП кор.} - c} - 1 \right)$$

(см. Стр. 22 оригинального описания)

Большинство современных ридеров позволяют вычислять такого рода формулы автоматически при обчете результатов измерений.

Интервал измерений от 0,45 до 15 AU/ml. Все пробы со значением выше интерпретируются как > 15 AU/ml. Значения выше 15 не экстраполируются и образцы должны быть исследованы с использованием большего разведения.

The cut-off = 0.55 AU/ml

Серая зона = 0,45 - 0,65 AU/ml

6B. Интерпретация результатов

Пробы, значения которых ниже серой зоны оцениваются как **отрицательные**.

Пробы, значения которых лежат внутри серой зоны оцениваются как **сомнительные**.

Значения в пограничной зоне должны контролироваться, тем что через 14 дней берется дополнительная проба пациентов, которая вместе с первой исследуется на изменение титра (подъем или спад) IgG.

Пробы, значения которых, превышают серую зону, оцениваются как **положительные**.

Результаты должны интерпретироваться вместе с другими диагностическими параметрами (например, CMV - IgM и CMV - IgA антителами) и клиническими данными.

Низкоположительные ложные значения измерений могут быть результатом реакций против других герпес-подобных или гетерофильных антител, вызывающих подобный результат.

Высокие концентрации липидов в положительных пробах могут влиять на результаты. Высокие концентрации Гемоглобина и Билирубина не оказывают влияние на результаты измерений.

Специфичность = 97.1%

Чувствительность = 100%

7. Общие указания

Флаконы с реагентами и их крышки не путать, во избежание перекрестной реакции.

Сразу после использования флаконы с реагентами снова плотно закрыть, чтобы избежать испарения и заражения микробами.

После использования реагенты следует хранить согласно предписанным условиям хранения, чтобы обеспечить указанный срок годности.

Указания по безопасности

Следует соблюдать основные правила по безопасности для лабораторий.

Не раскапывать ртом.

Реагенты человеческого происхождения были исследованы на HCV, ВИЧ - 1 и ВИЧ - 2 - антитела и не определены как зараженные. Несмотря на это следует обращаться с реагентами как с потенциально инфицированными, чтобы избежать возможности заражения.

Данные по специфичности, чувствительности и точности см. Стр. 24 оригинальной инструкции.