

CMV-IgM-ELA Test PKS medac

Русский



ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Fehlandtstraße 3
D-20354 Hamburg

ОТДЕЛ МАРКЕТИНГА

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Geschäftseinheit Diagnostika
Theaterstraße 6
D-22880 Wedel

Phone: ++49/ 4103 / 8006 - 351
Fax: ++49/ 4103 / 8006 - 359

АДРЕС

Phone: ++49/ 4103 / 8006 - 111
Fax: ++49/ 4103 / 8006 - 113

CMV-IgM-ELA Test PKS medac

Иммуноферментный анализ с Системой Контроля Пипетирования для определения IgM антител к Цитомегаловирусу (CMV)

Кат. No.: 110-PKS

Только для диагностики in vitro

ВВЕДЕНИЕ

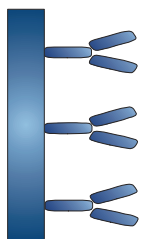
Цитомегаловирус (CMV) относится к семейству вирусов герпесов, выделяется двойным характерным геном ДНК. Типичным для таких вирусов является то, что при первичном инфицировании инфекция развивается в организме латентно. При определенных обстоятельствах это может привести к реактивации вылеченного вируса.

Инфекции CMV у иммунокомпетентных лиц протекают, как правило, незаметно. Напротив, у лиц с ослабленным иммунитетом (например, у пациентов трансплантологии, у ВИЧ-инфицированных, больных раком, новорожденных) наблюдаются тяжелые симптомы различного характера.

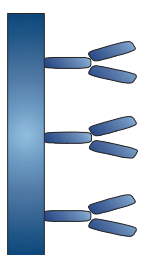
Особое значение придается CMV как частому возбудителю пренатальной инфекции. Подобного рода инфекция может нанести серьезный вред здоровью ребенка, при этом не исключены запоздалые проявления инфекции у детей, при рождении которых никаких симптомов вируса не наблюдалось.

CMV-IgM-ELA Test PKS medac предназначен для обнаружения специфических CMV IgM антител в сыворотке пациентов. Острая цитомегаловирусная инфекция может быть диагностирована при обнаружении IgM антител. Однако IgM антитела продуцируются не всегда. Например, у пациентов с иммунной недостаточностью IgM антитела редко обнаруживаются при реинфекции.

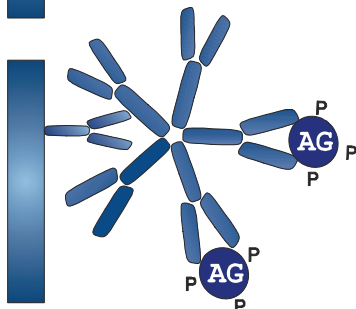
Принцип теста



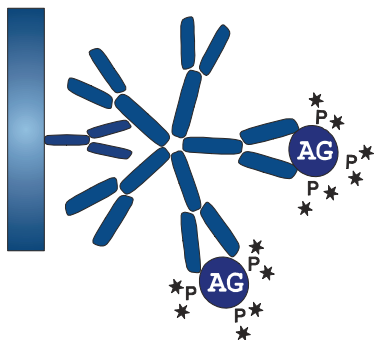
Планшет покрытый античеловеческим IgM иммуноглобулином.



IgM фракция сыворотки связывается с лунками.



CMV-специфические IgM антитела связываются с фермент-меченым CMV антигеном (AG = антиген, P = пероксидаза).



Инкубация с ТМВ-субстратом (*). Реакция останавливается добавлением стоп раствора. Абсорбция определяется фотометрически.

Преимущества теста

- ☞ Отсутствие неспецифических реакций и ложноположительных результатов вызванных ревматоидным фактором.
- ☞ Высокие титры IgG не блокируют IgM.
- ☞ С помощью Системы Контроля Пипетирования можно контролировать каждое раскапывание отдельно благодаря изменениям цвета.
- ☞ Ломательные микроstriпы гарантируют оптимальное использование теста
- ☞ Пригоден для использования на автоматических открытых системах оборудований ELISA.

СОДЕРЖИМОЕ УПАКОВКИ

Кат No.: 110-PKS

1. **МТР**
Микропланшет: 12 стрипов по 8 лунок (с рамкой и влагопоглощающей прокладкой), U-образной формы, покрыты козими анти-человеки IgM иммуноглобулином, содержит бычий сывороточный альбумин и pH индикатор, готов к использованию.
2. **CONTROL -**
Отрицательный контроль: 1 флакон - 1,5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, содержит бычий сывороточный альбумин, фенол, ProClin™ 300 и гентамицин сульфат.
3. **CONTROL +**
Положительный контроль: 1 флакон - 1,5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, содержит бычий сывороточный альбумин, фенол, ProClin™ 300 и гентамицин сульфат.
4. **WB**
Моющий буфер: 1 флакон 100 мл, PBS/Tween (10x), pH 7,2 - 7,4, содержит ProClin™ 300.
5. **VIR-DIL**
Буфер для разведения проб: 1 флакон 110 мл PBS/Tween/NBCS, pH 7,2 - 7,4, готов к использованию, содержит ProClin™ 300.
6. **ANTIGEN**
CMV-IgM-ELA (Фермент меченный антиген): 2 флакона по 5 мл каждый, содержит FCS, окрашен в красный цвет, HRP - конъюгированный.
7. **TMB**
TMB-субстрат: 1 флакон 10 мл, готов к использованию.
8. **STOP**
Стоп - раствор: 2 флакона по 11 мл каждый, 0,5 М серной кислоты (H₂SO₄), готов к использованию.

1. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ

Материал/реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Тест - упаковка	не открытая	2 - 8 °С	до истечения срока годности
Микропланшет	открытый	2 - 8 °С закрытый в алюминиевый пакет с осушителем- влагопоглотителем	6 недель
Контроли	открытые	2 - 8 °С	6 недель
Моющий буфер	разведенный	2 - 8 °С	6 недель
Буфер для разведения проб	открытый	2 - 8 °С	6 недель
CMV-IgM-EIA	разведенный	2 - 8 °С	5 дней
		≤ -18 °С *	6 недель
ТМВ-субстрат	открытый	2 - 8 °С	6 недель
Стоп - раствор	открытый	2 - 8 °С	до истечения срока годности

* Не замораживать аликвот после оттаивания.

Не использовать реагенты после истечения срока годности.

2. ДОПОЛНИТЕЛЬНО НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

- 2.1. Вода для инъекций (бидистиллированная вода). Использование деионизированной воды может привести к ошибкам при проведении теста.
- 2.2. Микропипетки с изменяемым объемом.
- 2.3. Чистый стеклянный или пластиковый сосуд для приготовления моющего буфера и проб.
- 2.4. Необходимое оборудование для промывки микропланшет (мультистеппер или микропланшетный вошер).
- 2.5. 37 °С - инкубатор.
- 2.6. Микропланшетный ридер (фотометр) с фильтрами 450 нм и 620 - 650 нм.

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ

Перед проведением теста все компоненты набора необходимо довести до комнатной температуры.

Рассчитать необходимое количество стрипов.

3.1. Микропланшет

После каждого взятия стрипов алюминиевый пакет должен плотно закрываться вместе с влагопоглощающей прокладкой. Срок годности и условиях хранения указаны в п.1.

Примечание: стрипы могут приобретать слабо окрашенный зеленый оттенок. В некоторых случаях в них могут появиться зелено-коричневые пятна, это обусловлено производственными факторами и не мешает проведению теста.

3.2. Моющий буфер

Смешать одну часть концентрата моющего буфера (10x) с девятью частями бидистиллированной воды (например, 50 мл концентрата моющего буфера (10x) – с 450 мл бидистиллированной воды). На 8 лунок необходимо 10 мл разведенного моющего буфера.

Кристаллы концентрата моющего буфера (10x) растворяются при нагревании (макс. 37 °С) и/или при взбалтывании при комнатной температуре.

3.3. CMV-IgM-ELA

Смешать лиофильный антиген с 5,0 мл **буфера для разведения проб**. Мягко смешать и следить за тем, что бы частицы растворились.

После приготовления, CMV-IgM-ELA окрашивается в красный цвет и готов к использованию.

Не смешивать реагенты одной партии (микропланшет, контроли, CMV-IgM-ELA) с реагентами других партий или других производителей. Напротив, моющий буфер, ТМВ-субстрат и стоп раствор, могут быть заменены во всех наборах вирусологических наборах ELISA medac.

Реагенты других производителей не должны быть использованы.

Точные и воспроизводимые результаты получаются, если процедура теста выполняется точно.

4. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

4.1. Вид исследуемого материала: сыворотка.

4.2. Сыворотки не требуют специальной инактивации. Однако они не должны быть контаминированы микроорганизмами или содержать эритроциты.

4.3. Сыворотки должны быть разведены 1:100 буфером для разведения проб. Они могут быть разведены далее для определения титра.

5.А. ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТА

5.1. Упаковку планшета вскрыть по линии вскрытия и взять необходимое количество стрипов (см. 3.1.).

Микроланшет готов к использованию и не требует предварительной отмывки.

5.2. Оставить лунку A1 пустой, используемую в качестве бланка (см. 6.А.). В соответствующие лунки планшета добавить по 50 мкл Отрицательного контроля (в двух повторях), Положительного контроля и разведенной сыворотки пациентов.

После раскапывания образцы (рН нейтральные или щелочная среда) в лунках окрасятся в синий цвет. Отсутствие смены цвета говорит о том, что в лунки не был добавлен образец или контроль.

При необходимости, микропланшеты могут храниться во влажной камере при комнатной температуре в течении 30 минут или при 2 – 8 °С в течении 60 минут перед постановкой теста.

5.3. Стрипы инкубировать в течение 60 мин (± 5 мин) при температуре 37 °С (± 1 °С) во влажной камере или заклеенными инкубационной оберточной фольгой.

5.4. Развести CMV-IgM-EIA (см. 3.3.)

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

Не позволяйте лункам высохнуть! Незамедлительно использовать!

5.6. Добавить CMV-IgM-EIA (красного цвета) в каждую лунку (исключая A1).

50 мкл EIA добавляется в лунки если процедура теста выполняется вручную.

Пожалуйста помните:

При работе на автоматических приборах из-за большого испарения в инкубаторе прибора каждую лунку должно быть пипетировано по 60 мкл

Подходимость тестов для автоматических анализаторов была подтверждена эмпирическим путем. Несмотря на то мы предлагаем проверять совместимость тестов с используемым оборудованием.

- 5.7. Инкубировать в течение 60 мин (± 5 мин) при температуре 37° С (± 1 °С) во влажной камере или заклеенными в инкубационную оберточную фольгу.
- 5.8. После инкубации снова промыть микрострипы (см.п.5.5).
- 5.9. Добавить во все лунки 50 мкл ТМВ-субстрата (включая А1) и инкубировать в течение 30 минут (± 2 мин) при температуре 37 °С (± 1 °С) во влажной камере или заклеенными в инкубационную фольгу в темноте. Положительные пробы приобретут голубой цвет.
- 5.10. Добавить 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку для остановки реакции. У положительных сывороток происходит смена окраски с голубого на желтый.

Перед фотометрическим считыванием очистите наружную поверхность дна лунок и проследите, чтобы в лунках отсутствовали воздушные пузырьки.

Считывание необходимо производить в течение 15 минут после добавления стоп-раствора!

5.Б. ТАБЛИЦА РАБОЧЕЙ ПРОЦЕДУРЫ

	Бланк (А1)	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Пробы
Отрицательный контроль	-	50 мкл	-	-
Положительный контроль	-	-	50 мкл	-
Пробы	-	-	-	50 мкл
Инкубировать 60 мин при 37° С, промыть 3 раза по 200 мкл промывающим буфером				
Антиген-конъюгат смесь	-	50/60 мкл*)	50/60 мкл*)	50/60 мкл*)
Инкубировать 60 мин при 37° С, промыть 3 раза по 200 мкл промывающим буфером				
ТМВ-субстрат	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Инкубировать 30 минут при 37 °С в темноте				
Стоп - раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Фотометрическое считывание при 450 нм (референс 620 - 650 нм)				

*) ручная/автоматическая процедура (см.п.5.6.)

6.А. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ (ВАЛИДНОСТЬ)

- * Считывание значений ОП производится при длине волны 450 нм (референс 620 – 650 нм) .
- * Вычитите значение ОП бланка (лунка А1) из всех других значений ОП.
- * Среднее значение ОП **отрицательного контроля** должно быть **< 0,100**.
Среднее значение ОП **положительного контроля** должно быть **> 0,800**.
- * **Cut - off = среднее значение ОП отрицательного контроля + 0,140**
- * **Серая зона = Cut - off ± 10 %**

Тест необходимо повторить, если критерии валидности не были выполнены.

6.Б. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ:

- * Пробы, значения ОП которых лежат ниже нижней границы серой зоны, оцениваются как **отрицательные** .
- * Пробы, значения ОП которых лежат в пределах серой зоны, оцениваются как **неопределенные** . Они должны быть повторно протестированы параллельно со свежими образцами, взятыми 14 дней спустя для того чтобы определить изменение титра.
- * Пробы, значения ОП которых лежат выше верхней границы серой зоны, оцениваются как **положительные** .
- * Результаты всегда должны быть интерпретированы в соответствии с клиническими показаниями пациентов, а так же с дополнительными диагностическими параметрами.
- * Перекрестные реакции, обусловленные антитела к другим герпес вирусам не могут быть исключены в отдельных случаях.
- * Очень высокие концентрации липидов в крови в отрицательных образцах могут вызвать ложно – положительные результаты. Высокое содержание гемоглобина и билирубина в сыворотке не влияет на результаты.

7. ХАРАКТЕРИСТИКИ

Следующие характеристики были определены в процессе диагностической валидации.

7.А. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

482 сыворотки полученные у доноров крови и пациентов, были исследованы на CMV-IgM-EIA в сравнении с высоко специфичными тест-системами, которые рутинно используются в лабораториях. Результаты приведены в следующей таблице:

CMV-IgM-EIA Test PKS	Референс тест	
	отрицательный	положительный
	отрицательный	314
положительный	1	166

Чувствительность = 99,40 %

Специфичность = 99,68 %

Положительные predetermined данные: 99,40 %

Отрицательные predetermined данные: 99,68 %

7.Б. ТОЧНОСТЬ

Образец	Колебания внутри теста				Образец	Колебания вне теста		
	mean OD	SD	CV (%)	n		mean OD	SD	CV (%)
NC	0,034	0,005	15	24	NC	0,050	0,010	20
BC	0,314	0,013	4	24	BC	0,230	0,021	9
PC	2,269	0,048	2	24	PC	1,456	0,064	4
N° 1	0,049	0,008	16	27	N° 4	0,058	0,007	12
N° 2	0,317	0,023	7	27	N° 5	0,264	0,037	14
N° 3	2,673	0,086	3	27	N° 6	0,271	0,039	14
					N° 7	1,788	0,073	4

NC = отрицательный контроль; BC = слабый положительный контроль (не включен в тест-набор); PC = положительный контроль

ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- * Не путать флаконы с реактивами и их крышки.
- * Флаконы с реактивами после использования необходимо сразу же плотно закрыть, во избежание испарения и микробного заражения.
- * После использования остатки реагентов хранить согласно предписаниям по хранению, чтобы обеспечить указанный срок годности.
- * После использования, все компоненты тест-набора должны быть упакованы в оригинальную упаковку, во избежание смешивания реагентов других тест-систем и лотов (см. 3.).

УКАЗАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- * Следует придерживаться предписаниям по технике безопасности для лабораторий.
- * Реактивы, произведенные из человеческих биоматериалов, были проверены на HBsAg, HCV, HIV 1 и -2 антитела и классифицированы как неинфицированные. Однако рекомендуется обращаться с данным материалом как потенциально инфицированным, полученными из биологических образцов животных, соблюдая необходимые меры предосторожности.

ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ

Остатки химических препаратов в целом рассматриваются как опасные отходы. Обезвреживание и удаление отходов этого характера производится в соответствии с национальными и региональными инструкциями. Свяжитесь с местными специалистами или учреждениями по вопросам обезвреживания и удаления опасных отходов, где вы смогли бы получить соответствующие рекомендации.

Дата составления: 01.07.2008

OE3OP

Enders, G.: Infektionen und Impfungen in der Schwangerschaft. Urban und Schwarzenberg, München, 9-30 (1990).

Flik, J.: A comparison of 2 quantitative ELISAs used to detect IgG antibodies against HCMV in transplant recipients. Poster presented at the 5th Int. Cytomegalovirus Conference (1995).

Jethon, C., Doerr, H. W., Weber, B.: Serologische Diagnose der *Cytomegalievirus*-Infektion: Evaluierung von drei Enzymimmunoassays zum Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern in Serumproben von immunkompetenten und immunsupprimierten Patienten. Lab. Med. 20 (9), 480-484 (1996).

Reimer, K. und Meisel, H.: Humanes Zytomegalievirus, in: Diagnostische Bibliothek Bd.1, Porstmann, T. (Hrsg.), Blackwell Wissenschaftsverlag, 279-290 (1996).

Schmitz, H., Doerr, H. W., Kampa, D. and Vogt, A.: Solid-phase enzyme immunoassay for IgM antibodies to *Cytomegalovirus*. J. Clin. Microbiol. 5, 629-634 (1977).

Schmitz, H., Kampa, D., Doerr, H. W., Luthardt, T., Hillemanns, H. G. and Würtele, A.: IgM antibodies to *Cytomegalovirus* during pregnancy. Arch. Virol. 53, 177-184 (1977).

Schmitz, H., von Deimling, U. and Flehmig, B.: Detection of IgM antibodies to *Cytomegalovirus* (CMV) using an Enzyme-Labelled Antigen (ELA). J. Gen. Virol. 50, 59-68 (1980).

Steinmann, J. and Bischoff, J.: Comparison of serological methods for the detection of *Cytomegalovirus* infection. Lab. Med. 15, 585-589 (1991).

Tönnies, R., Flik, J., Franke, D., Metzger, C., Daiminger, A., Bäder, U. and Enders, G.: Comparison of three methods used to differentiate between primary and recurrent or long-term human *Cytomegalovirus* infections in pregnant women. Poster presented at the 6th International Cytomegalovirus Workshop, Orange Beach, AL, USA (1997).

Weber, B., Prosser, F., Munkwitz, A. and Doerr, H. W.: Serological diagnosis of *Cytomegalovirus* infection: comparison of 8 enzyme immunoassays for the detection of HCMV-specific IgM antibody. Clin. Diagn. Virol. 2, 245-259 (1994).