



ImmunoComb® II

CMV IgG



Code: 60460002 Format: 3 x 12 tests

Только для *in vitro* диагностики

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И
СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2007/00769
от 15 июня 2009 г.

Назначение

ИФА тест-система ИммуноКомб «ImmunoComb® II CMV IgG» - это быстрый тест для количественного определения IgG антител к цитомегаловирусу (CMV) в сыворотке или плазме крови человека. Набор предназначен для проведения 36 тестов.

Введение

Цитомегаловирус (CMV) принадлежит к семейству вирусов Herpesviridae. Это повсеместно распространенный вирус с большой вероятностью заражения в течение первых пяти лет жизни. Не менее 80% взрослого населения всего мира имеет антитела к CMV. Основными источниками передачи CMV инфекции являются внутриутробное инфицирование, при родах, или при переливании крови, препаратов крови, слюна, а также другие жидкости, вырабатываемые организмом человека. Заражение CMV в большинстве случаев протекает бессимптомно. Тем не менее, иногда возможны постоянно повышенная температура, пневмония, энтерит, мононуклеоз и гепатит.

В следующих двух случаях CMV инфекция может вызвать серьезные осложнения: первичное инфицирование на ранних стадиях беременности, может способствовать врожденным дефектам плода, а также данное заболевание чревато осложнениями для иммунодефицитных больных, таких как реципиенты пересадки органов и костного мозга, а также людей, страдающих синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД). Для пациентов с пересаженными органами CMV является наиболее часто встречающейся причиной смерти. У больных ВИЧ инфекцией CMV чаще всего поражает легкие, кишечник и центральную нервную систему. В результате серьезного осложнения возникший ретинит может привести к слепоте.

Скрининг на IgG антитела к CMV позволяет выявлять людей, инфицированных CMV в прошлом. Определение уровня IgG антител к CMV через недельные или двухнедельные интервалы также позволяет диагностировать острую инфекцию,

посредством выявления значительного повышения титра антител.

Принцип анализа

В тест-системе ImmunoComb® II CMV IgG используется метод непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Твердой фазой является Гребень с 12 зубцами. Каждый зубец сенсибилизирован в двух местах:

верхняя точка – иммуноглобулином человека (Внутренний контроль)
нижняя точка – инактивированными антигенами CMV.

Проявочная ванна состоит из 6 рядов (A - F) по 12 лунок в каждом. Все ряды содержат готовые к использованию растворы реагентов для различных этапов анализа. Анализ проводится поэтапно, посредством перенесения Гребня из одного ряда лунок в другой, с инкубацией на каждом этапе.

Перед началом анализа образцы сыворотки или плазмы крови человека разводятся в соотношении 1:11 и добавляются к растворителю в лунках ряда А Проявочной ванны. Затем в лунки ряда А вставляется Гребень. Антителка к CMV, если они присутствуют в образце, специфически связываются с антигенами CMV на нижних точках зубцов Гребня (Рис. 1). Несвязанные компоненты смываются в лунках ряда В. В лунках ряда С IgG антитела к CMV, захваченные на нижних точках зубцов и иммуноглобулин человека на верхних точках (Внутренний контроль) будут взаимодействовать с антителами к IgG человека, меченными щелочной фосфатазой (alkaline phosphatase AP). В следующих двух рядах не связавшиеся компоненты удаляются промывкой. В ряду F связанная щелочная фосфатаза взаимодействует с хромогенными компонентами. Результаты реакции наблюдаются визуально в виде серо-синих точек на поверхности зубцов Гребня.

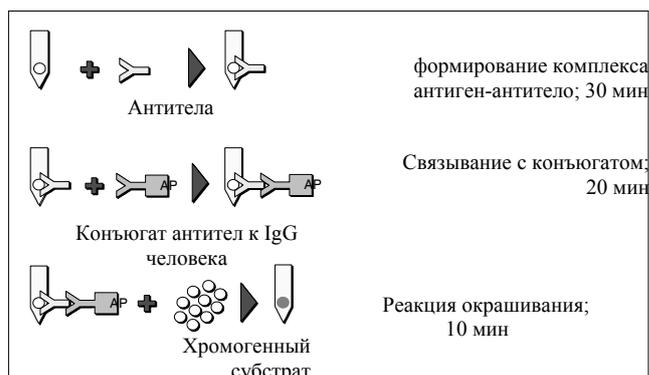


Рис. 1. Принцип анализа

В набор входит Положительный Контроль (содержащий IgG антитела к CMV) и Отрицательный Контроль, которые используются при анализе каждой группы образцов. По завершении анализа на зубце с Положительным Контролем должны проявиться две серо-синие точки. На зубце с Отрицательным Контролем должна появиться только верхняя точка, нижняя точка либо отсутствует, либо она слабоокрашена. Верхняя точка должна проявиться на всех остальных зубцах, подтверждая, что тест-система не была повреждена во время хранения и транспортировки, и анализ проведен правильно.

Состав набора

Гребни

Набор содержит 3 пластиковых Гребня. Каждый из них имеет 12 зубцов, по 1 зубцу на каждый тест (Рис. 2). Каждый зубец сенсибилизирован в двух чувствительных областях:

верхняя точка – иммуноглобулином человека (Внутренний контроль)
нижняя точка – инактивированными антигенами CMV.

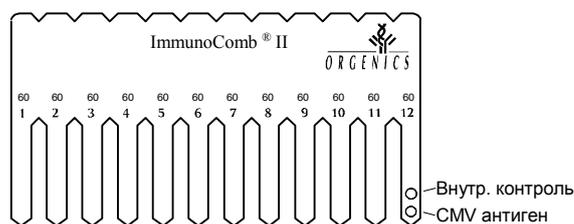


Рис. 2 Гребень

Гребни поставляются в алюминиевых упаковках с влагопоглотителем.

Проявочные ванны.

В набор входят 3 Проявочных ванны, покрытых фольгой. Каждая из них (Рис. 3) содержит все необходимые для проведения анализа реагенты. Проявочная ванна состоит из 6 рядов (A-F) по 12 лунок в каждом.

Содержимое каждого ряда следующее:

Ряд А	растворитель образца
Ряд В	промывочный раствор
Ряд С	козы антитела к IgG человека, меченные щелочной фосфатазой (AP-конъюгат)
Ряд D	промывочный раствор
Ряд E	промывочный раствор
Ряд F	раствор хромогенного субстрата (окрашивающего вещества), содержащий 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат (BCIP) и нитротетразол синий (NBT)

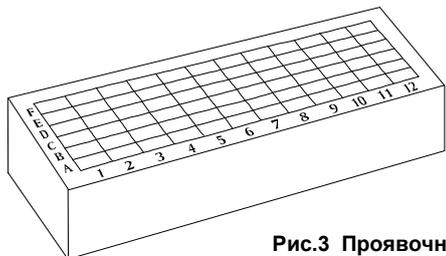


Рис.3 Проявочная ванна

Положительный Контроль - 1 флакон (красная крышка) 0.2 мл инактивированной нагреванием плазмы крови человека, разведённой до учетного уровня 1 МЕ/мл(IU/ml) IgG антител к CMV.

Отрицательный Контроль - 1 флакон (зелёная крышка) 0.2 мл инактивированной нагреванием реконструированной плазмы крови человека, отрицательной по антителам к CMV.

Разбавитель образца - 1 флакон 5 мл.

Перфоратор – пластиковый стержень для прокалывания алюминиевой фольги, покрывающей лунки Проявочной ванны.

Шкала CombScale™ - для считывания результатов анализа.

Меры Предосторожности

Биоматериалы, использованные при приготовлении набора, были проверены на наличие вируса гепатита В, на наличие антител к вирусу гепатита С и к ВИЧ и показали отрицательный результат. Поскольку ни один тест не может дать полной гарантии в отсутствии вирусного заражения, при работе с исследуемыми образцами и контрольными растворами следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом:

- Используйте хирургические перчатки и лабораторную одежду. Следуйте принятым лабораторным процедурам для работы с человеческой сывороткой или плазмой.
- Не всасывайте растворы в пипетку ртом.
- Обращайтесь со всеми образцами, использованными Гребнями*, Проявочными ваннами и другими материалами в наборе как с потенциально опасными отходами.
- Не смешивайте реагенты из наборов разных серий.
- Не используйте набор после срока годности.

Срок годности, условия хранения и транспортировки

- Срок годности - 12 месяцев.
- Хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре 2-8°C. Не допускать замораживания.
- Возможна транспортировка в течение 3-5 суток при температуре не превышающей 26°C. Внутренний контроль тест-системы подтверждает сохранность реагентов при транспортировке.
- После вскрытия набора хранить составляющие его компоненты при температуре 2-8°C.
- Не рекомендуется использовать Гребень и Проявочную ванну более 3 раз после первичного использования.

Подготовка образцов

- Можно анализировать либо сыворотку, либо плазму крови человека.
- Образцы перед анализом можно хранить до 7 дней при температуре 2-8°C. Для более длительного хранения образцы должны быть заморожены до температуры -20°C или ниже.

- После оттаивания все замороженные исследуемые материалы должны быть отцентрифугированы. Аккуратно заберите исследуемый образец из супернатанта (верхний слой). Если на поверхности жидкости образовался липидный слой, убедитесь, что материал для исследования был взят из нижнего прозрачного слоя. Избегайте повторных замораживаний и оттаиваний.
- Антикоагулянты, такие как гепарин, EDTA, цитрат натрия не влияют на результаты теста.
- При экстренных анализах можно использовать цельную кровь (венозную, пальцевую) в количестве, в 2 раза превышающем количество сыворотки или плазмы, указанное в инструкции к тест-системе.

Процедура анализа

Необходимое оборудование

- Прецизионные пипетки - дозаторы со сменными наконечниками для внесения 10 мкл, 25 мкл и 100 мкл.
- Ножницы
- Лабораторный таймер или часы.
- Микропипетки или микротитратор с лунками.

Подготовка к анализу

Доведите все компоненты, Гребни, реагенты и образцы до комнатной температуры (22-26°C), процедуру анализа проводите при этой же температуре.

Подготовка Проявочной ванны

1. Выдержите Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 20 минут; либо при комнатной температуре (22-26°C) в течение 3 часов. Перенесите необходимые для проведения анализа компоненты набора (Гребень, образцы, контроли, разбавитель образца) в помещение с комнатной температурой.
2. Застелите рабочий стол фильтровальной бумагой, которая после окончания работы должна быть уничтожена как биологически опасные отходы.
3. Перемешайте реагенты, встряхивая Проявочную ванну.

Примечание: Не удаляйте всю фольгу, покрывающую Проявочную ванну. Вскрываете фольгу только в соответствии с указаниями инструкции по проведению анализа с помощью сменного наконечника пипетки или перфоратора.

Подготовка Гребня

Внимание: Чтобы обеспечить правильное функционирование теста, не прикасайтесь к зубцам Гребня.

1. Разорвите пакет с Гребнем вдоль надсеченного края. Извлеките Гребень.
2. Гребень и Проявочную ванну можно использовать целиком или только их часть. Для использования части Гребня:
 - a. Определите количество зубцов, необходимых для тестирования образцов и контролей. Вам потребуется по одному зубцу на каждый анализ. На каждом зубце изображен кодовый номер набора "60" для того, чтобы всегда можно было определить, к какому набору принадлежит отдельно взятый зубец.
 - b. Согните Гребень по вертикали, сломайте или отрежьте ножницами (см. Рис. 4) требуемое число зубцов.
 - c. Верните неиспользуемую часть Гребня в алюминиевую упаковку с влагопоглотителем. **Плотно закройте упаковку**, например, канцелярской скрепкой, чтобы избежать проникновения влаги. Храните Гребень в оригинальной упаковке набора при температуре 2-8°C для дальнейшего использования.

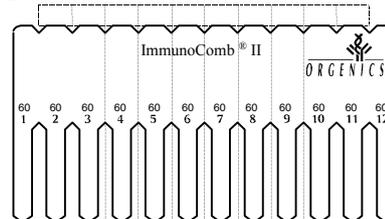


Рис.4.Разделение Гребня

* За исключением хранения для документации

Инструкция по проведению анализа

Предварительная обработка образцов и контролей.

1. Для каждой образца и контроля введите по 100 мкл разбавителя в микропипетку или лунку микротитратора.
2. В каждую микропипетку или лунку добавьте 10 мкл образца или контроля. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор.

Реакция Антиген-Антитело (Ряд А)

3. Наберите в пипетку 25 мкл предварительно разведенного образца. Проколите наконечником пипетки или перфоратором фольгу в одной из лунок ряда А Проявочной ванны и введите образец на дно лунки. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор. Смените наконечник пипетки.
4. Повторите этап 3 для других предварительно разведенных образцов и контролей. Используйте новую лунку из ряда А и меняйте наконечники пипетки для каждого образца и контроля.
5.
 - a. Вставьте Гребень (печатной стороной к себе) в лунки ряда А, содержащего образцы и контроли.
Перемешивание: Вставляйте и вынимайте Гребень в лунки (несколько раз).
 - b. Оставьте Гребень в лунках ряда А и выдержите ровно 30 минут. Включите таймер. За несколько минут до окончания инкубации проколите перфоратором фольгу лунок ряда В. Открывайте только необходимое количество лунок.
 - c. По истечении 30 минут извлеките Гребень из ряда А. **Удалите оставшиеся капли жидкости с заостренных концов зубцов Гребня** фильтровальной бумагой. Не касайтесь передней части поверхности зубцов.

Первая промывка (Ряд В)

6. Вставьте Гребень в лунки ряда В. **Прополощите:** энергично вынимайте и вставляйте Гребень в лунки в течение 10 секунд для более тщательной промывки. Повторите прополаскивание несколько раз в течение 2 минут; между тем проколите фольгу лунок ряда С. По истечении 2 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости** как на этапе 5с

Связывание с Конъюгатом (Ряд С)

7. Вставьте Гребень в лунки ряда С. **Помешайте** как на этапе 5а. Включите таймер на 20 минут. Проколите фольгу лунок ряда D. Через 20 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Вторая промывка (Ряд D)

8. Введите Гребень в лунки ряда D. **Прополощите** в течение 2 минут, как на этапе 6. Тем временем проколите фольгу в лунках ряда E. Через 2 минуты извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Третья промывка (Ряд E)

9. Вставьте Гребень в лунки ряда E. **Прополощите** в течение 2 минут. Тем временем проколите фольгу в лунках ряда F. По истечении 2 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Цветная реакция (Ряд F)

10. Вставьте Гребень в лунки ряда F. **Перемешайте**. Включите таймер на 10 минут. Через 10 минут извлеките Гребень.

Остановка реакции (Ряд E)

11. Вставьте Гребень снова в лунки ряда E. Через 1 минуту извлеките Гребень и просушите его на воздухе.

Хранение неиспользованных частей набора

Проявочная ванна

Неиспользованные лунки Проявочной ванны можете хранить для дальнейшего исследования следующим образом:

- заклейте использованные лунки широкой лентой во избежание пролития, в случае опрокидывания Проявочной ванны.

Другие материалы набора

- Верните оставшиеся Проявочные ванны, Гребни, перфоратор, контроли, разбавитель образца и инструкцию обратно в оригинальную упаковку набора. Храните при температуре 2–8°C.

Результаты анализа

Достоверность

Для подтверждения правильной работы теста и достоверности полученных результатов необходимо соблюдение трёх условий (см. Рис.5):

1. На зубце с **Положительным контролем** должно проявиться **две точки**.
2. На зубце с **Отрицательным контролем** должна присутствовать **верхняя точка** (Внутренний Контроль). Нижняя точка либо отсутствует, либо она слабоокрашенная и не влияет на интерпретацию результатов.
3. На каждом зубце тестируемых образцов должна проявиться **верхняя точка** (Внутренний Контроль).

Если одно из трёх вышеперечисленных условий не соблюдается, результаты анализа считаются недействительными, образцы и контроли должны исследоваться повторно.



Рис. 5. Достоверность результата

Считывание и Интерпретация результатов

Скрининг

Сравните интенсивность окрашивания **нижней точки** каждого зубца образца с интенсивностью окрашивания **нижней точки** зубца Положительного Контроля (Рис.6).

- Точка с интенсивностью окрашивания **большей** или **равной** интенсивности окрашивания точки Положительного Контроля указывает на **присутствие** IgG антител к CMV.
- Отсутствие точки или точка с **меньшей** интенсивностью окрашивания, чем точка Положительного Контроля рассматривается как отсутствие IgG антител к CMV (**Отрицательный результат**).



Рис. 6. Результаты теста

Количественная визуальная интерпретация результатов.

Уровень IgG антител к CMV в каждом образце можно определить, сравнивая интенсивность окраски **нижней точки** каждого зубца с цветовой шкалой CombScale, входящей в состав набора, следующим образом (Рис. 7):

1. Откалибруйте CombScale для оценки уровня IgG антител к CMV. Поместите **нижнюю** точку на зубце с **Положительным Контролем** под наиболее подходящий по интенсивности окраски участок на шкале. Сдвиньте линейку (RULER) так, чтобы надпись "1 ; C+" появилась в окошке над участком шкалы с выбранной окраской.

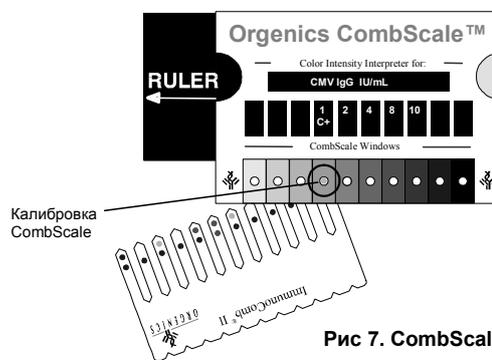


Рис. 7. CombScale

2. Считывайте результаты, **не меняя калибровочного положения линейки**. Для каждой нижней точки исследуемых образцов выберите участок шкалы наиболее близкий по интенсивности окраски. Запишите число в окошке над этим участком как концентрацию в МЕ/мл (IU/ml)* IgG антител к CMV в этом образце.

* Откалибрована по стандарту антител к CMV, предложенному CLB и WHO в 1995 году.

Документация результатов

Так как окраска точек стабильна, Гребни можно хранить для документации.

Ограничения

Результаты этого анализа, как и результаты любых других анализов, предназначенных для диагностики *in vitro*, следует оценивать в совокупности со всеми симптомами, клинической историей болезни и результатами других лабораторных обследований пациента.

Показатели качества теста*

Чувствительность и специфичность тест-системы **ImmunoComb® II CMV IgG** была оценена на 1054 образцах. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты испытаний

Контрольный метод	ImmunoComb® II CMV IgG	
	Положительный	Отрицательный
Положительный	597	34
Отрицательный	2	421

Следующие показатели качества были вычислены исходя из этих результатов:

- Чувствительность — 94,6 %
- Специфичность — 99,5 %

Повторяемость

Произвольно было выбрано 10 Гребней из разных наборов одной серии. Одна положительная сыворотка была проверена 12 раз на каждом из выбранных Гребней. На всех Гребнях наблюдалась одинаковая концентрация IgG антител к CMV.

Воспроизводимость

3 образца было проверено на Гребнях 3 различных серий. Каждый образец был протестирован несколько раз. Во всех случаях были получены одинаковые концентрации IgG антител к CMV.

Перекрёстные реакции

Перекрёстные реакции для образцов положительных по Rubella, Toxo, HIV, EBV, Chlamydia, CMV IgM, HBsAg аутоиммунные заболевания: ANA и RF были несущественными.

Интерференция

Не было замечено интерференции с гемолитическими образцами (гемоглобин до 10 мг/мл), образцами с липемией (холестерин до 281,6 мг/дл; триглицериды до 381,0 мг/дл) и с повышенным уровнем билирубина (до 20 мг/дл).

Библиография

- Corey L.** 1994. Herpesviruses, *In*: Sherris JC, ed. Medical Microbiology. An Introduction to Infectious Diseases. Edited by Kenneth J.R., Norwalk, C.T., Appleton & Lange.
- Clewley, G.S., Emery, V.C., Griffiths, P.** 1998. Diagnosis of CMV and other herpesviruses. *In*: Bowden, R.A., Ljungman, P., Paya, C.V., eds. Transplant infections. Philadelphia, Penn: Lippincott; p. 51-62.
- Hirsch, M.S.** 1998. Cytomegalovirus and human herpesvirus types 6, 7 and 8. *In*: Harrison's principles of internal medicine. Edited by Fauci, A.S., et al. New York: McGraw-Hill.
- Griffiths, P., Emery, V.** 1997. Cytomegalovirus. *In*: Clinical virology. New York, NY: Churchill, Livingstone. p. 445-470.
- Laing, R.B., Brettle, R.P., Leen, C.L.** 1997. Effect of CMV serology and CMV disease on AIDS morbidity and mortality. *Infection*. 25(4): p. 255.
- Landini, M.P.** 1993. New approaches and perspectives in Cytomegalovirus diagnosis. *In*: Melnick, J.L., ed Prog. Med Virol. Basel, Karger. Vol 40: pp. 157-177.
- Ljungman, P., Griffiths, P. and Paya, C.** 2002. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 34(8): p. 1094-1097.
- Maine, G.T., Lazzarotto, T., Landini, M.P.** 2001. New developments in the diagnosis of maternal and congenital CMV infection. *Expert Rev Mol Diagn*. 1(1): p. 19-29.

Подробные данные предоставляются по требованию. *

Условные обозначения

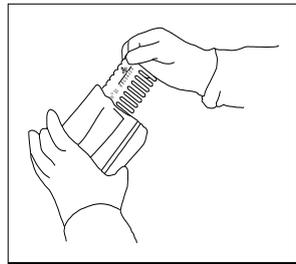
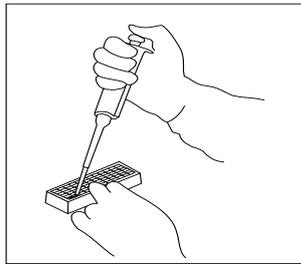
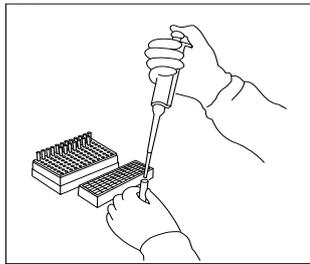
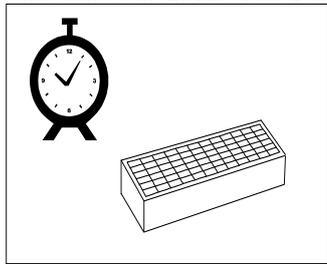
	Гребень
	Проявочная ванна
	Положительный Контроль
	Отрицательный Контроль
	Разбавитель образца
	Перфоратор
	Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
	Внимание, посмотрите сопроводительные документы
	Изделие медицинского назначения для диагностики <i>in vitro</i>
	Ограничения Температуры
	Содержимого достаточно для 36 тестов
	Производитель
	Уполномоченный Представитель в ЕС
	Каталожный Номер
	Шкала CombScale™
	Серия
	Срок годности: год-месяц-число
	Серийный номер

Эксклюзивный дистрибьютор в Российской Федерации ЗАО «Биоград»

Россия, 197110, г. Санкт-Петербург, Петровский пр., д. 14, литер А, офис 19-Н.
тел/факс: +7 (812) 325 21 70
<http://www.biograd.ru> biograd@biograd.ru

Organics Ltd., P.O.B. 360, Yavne 70650, Israel Tel: + 972 8 942 92 01 Fax: + 972 8 943 87 58 ©2008 Inverness Medical. All rights reserved	MedNet GmbH Borkstrasse 10 48163 Muenster - Germany Tel: + 49 251 32266-0 Fax: + 49 251 32266-22 Version: 60460002/R5/OR/CE (03/2009)

Описание основных этапов анализа

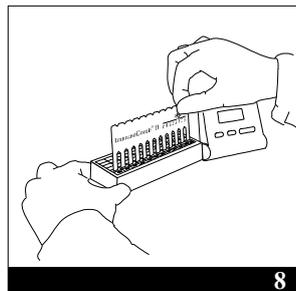
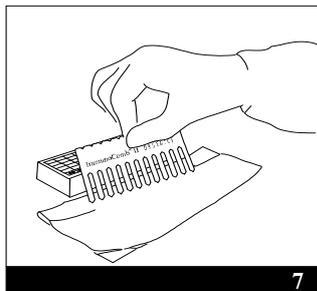
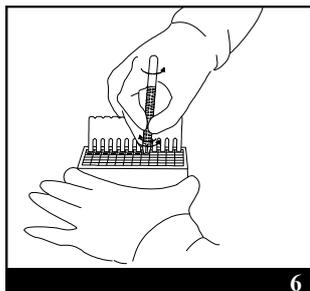
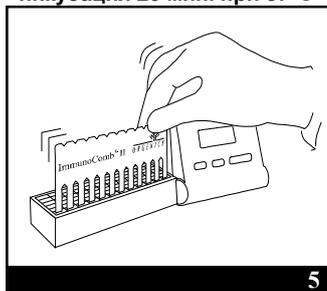


1
Подготовка Проявочной ванны:
- инкубация 3 часа при комнатной температуре; или
- инкубация 20 мин. при 37°C

2
Забор и разведение образцов и контролей

3
Внесение образцов и контролей в лунки ряда А. Перемешивание.

4
Извлечение Гребня из упаковки



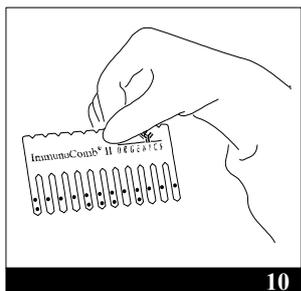
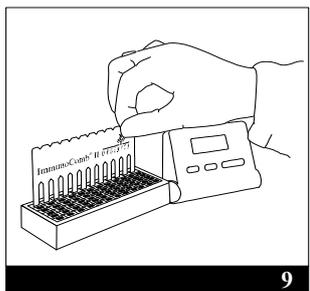
5
Введение Гребня в лунки ряда А. Инкубация

6
Вскрытие лунок ряда В перфоратором

7
Удаление капель жидкости с концов зубцов Гребня.

8
Внесение Гребня в лунки ряда В. Перемешивание. Инкубация.

После перемешивания / полоскания и инкубации в рядах С, D и E ...



9
Цветная реакция в ряду F

10
Результаты

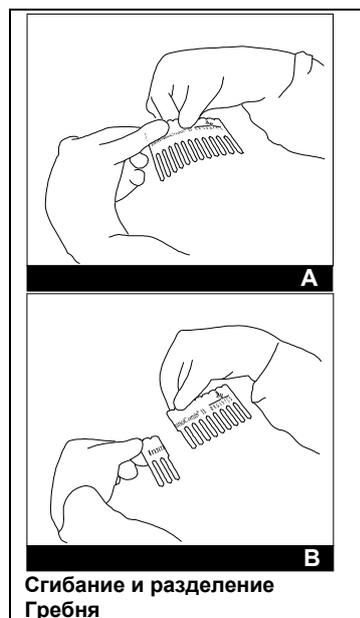
Краткое руководство по проведению анализов

Прилагаемая краткая инструкция предназначена для опытных пользователей набора ImmunoComb® II CMV IgG. (Полная инструкция приведена выше.)

1. Выдержать Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 20 минут или при комнатной температуре (22-26°C) в течение 3 часов, довести все необходимые компоненты набора до комнатной температуры. Проводить анализ при комнатной температуре (22-26°C).
2. Разведите по 10 мкл каждого образца и контроля 100 мкл разбавителя образцов.
3. Внесите 25 мкл каждого разведенного образца или контроля в лунки ряда А Проявочной ванны и перемешайте.
4. Вставьте Гребень в лунки ряда А и продолжайте анализ в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1. Краткое описание процедуры анализа.

Этап	Ряд	Действия
Реакция антиген - антитело	А	Перемешайте; инкубация 30 мин.; удалите капли
Промывка	В	Прополоскайте; инкубация 2 мин.; удалите капли
Связывание с конъюгатом	С	Перемешайте; инкубация 20 мин.; удалите капли
Промывка	D	Прополоскайте; инкубация 2 мин.; удалите капли
Промывка	E	Прополоскайте; инкубация 2 мин.; удалите капли
Окрашивание	F	Перемешайте; инкубация 10 мин.;
Остановка реакции	E	Инкубация 1 мин.; сушка на воздухе



Сгибание и разделение Гребня