



ImmunoComb® II

CMV IgM


ORGENICS


0459

Code: 60461002 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 IgM» – это быстрый тест для качественного определения IgM 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, препараты 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.

Выявление IgM антител к CMV позволяет проводить эффективную диагностику острого и текущего заболевания.

Данный тест полезен для наблюдения беременных женщин, которые ранее не подвергались CMV инфекции и, следовательно, не защищены от данного вируса. Также, выявление специфических IgM антител у новорожденных позволяет выявить врожденную CMV инфекцию.

Принцип анализа

В наборе ImmunoComb® II CMV IgM используется метод непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Твердой фазой является Гребень с 12 зубцами. Каждый зубец сенсибилизирован в двух чувствительных областях:

верхняя точка – IgM 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. Гребень переносится из одного ряда лунок в другой, с инкубацией на каждом этапе.

Перед началом анализа образцы сыворотки или плазмы крови человека обрабатываются антителами к IgG человека (очищающий раствор), чтобы избежать помех, связанных с конкурирующим взаимодействием IgG антител к CMV и Ревматоидного фактора (RF). Предварительно обработанные образцы проходят инкубацию в лунках ряда А Проявочной ванны. Затем в лунки ряда А вставляется Гребень. IgM антитела 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 IgM антитела, захваченные на нижних точках зубцов и IgM человека на верхних точках (Внутренний контроль) будут взаимодействовать с антителами к IgM человека, мечеными щелочной фосфатазой (alkaline phosphatase, AP). В следующих двух рядах (С и D) 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.

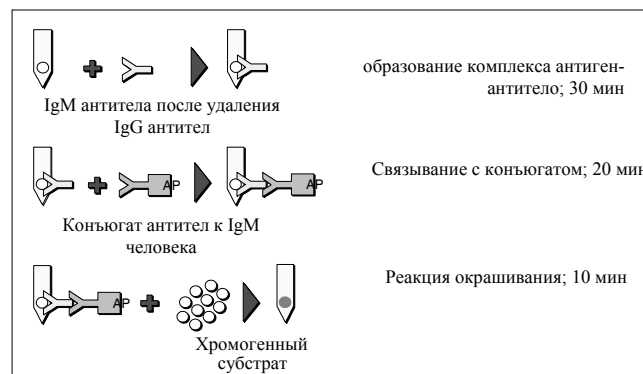


Рис. 1. Принцип анализа

В набор входят Положительный Контроль (содержащий IgM антитела к CMV) и Отрицательный Контроль, которые используются при анализе каждой группы образцов. По завершению анализа на зубце с Положительным Контролем должны проявиться две серо-синие точки. На зубце с Отрицательным Контролем должна проявиться верхняя точка. Нижняя точка либо отсутствует, либо 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 Гребень имеет по 12 зубцов, по 1 зубцу на каждый тест (Рис. 2). Каждый зубец сенсибилизирован в двух чувствительных областях:

верхняя точка – IgM человека (Внутренний контроль)

нижняя точка – инактивированными антигенами CMV

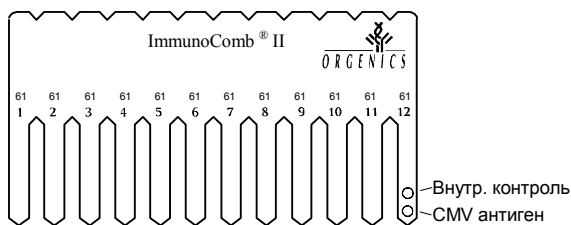


Рис. 2 Гребень

Гребни поставляются в алюминиевых упаковках с влагопоглотителем.

Проявочные ванны.

В набор входят 3 Проявочные ванны. Каждая из них (Рис. 3) содержит все необходимые для проведения анализа реагенты. Проявочная ванна состоит из 6 рядов (А-Ф) по 12 лунок в каждом. Содержимое каждого ряда следующее:

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

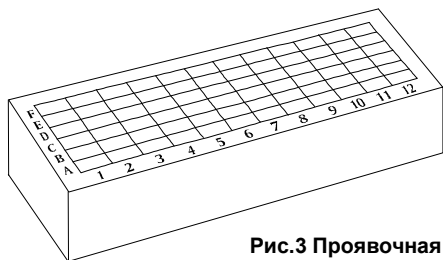


Рис.3 Проявочная ванна

Положительный Контроль - 1 флакон (красная крышка) 0.4 мл инактивированной нагреванием разведённой плазмы крови человека, содержащей IgM антитела к CMV.

Отрицательный Контроль - 1 флакон (зелёная крышка) 0.4 мл инактивированной нагреванием реконструированной человеческой плазмы, отрицательной по антителам к CMV.

Очищающий раствор - 1 флакон, содержащий 4 мл разбавленных козых антител к IgG человека.

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

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

* За исключением хранения для документации

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 25 мкл и 100 мкл.
- Ножницы
- Лабораторный таймер или часы.
- Микропробирки 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, очищающий раствор) в помещение с комнатной температурой
2. Накройте 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 алюминиевую упаковку с Гребнем вдоль надсеченного края. Извлеките Гребень.
2. Можно использовать Гребень и Проявочную ванну целиком, либо только их часть. Для использования части Гребня:
 - a. Определите количество зубцов, необходимое для анализа образцов и контролей. На каждый тест требуется по одному зубцу. На каждом зубце изображен кодировый номер набора "61" для дальнейшего определения принадлежности к набору его отделенных зубцов.
 - b. Согните Гребень по вертикали и 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.

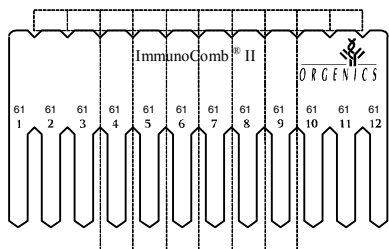


Рис.4.Разделение Гребня

Инструкция по проведению анализа

Предварительная обработка образцов и контролей.

1. Для каждого образца и контроля введите по 100 мкл очищающего раствора в микропробирку или лунку микротитратора.
2. В каждую микропробирку или лунку добавьте 25 мкл образца либо контроля, входящих в состав набора. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор.
3. Включите таймер, инкубируйте 10 минут.

Добавление предварительно обработанных образцов в Проявочную ванну

4. Наберите в пипетку 25 мкл предварительно обработанного образца. Проколите наконечником пипетки или перфоратором фольгу в одной из ячеек ряда А Проявочной ванны и введите обработанный образец на дно лунки. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор. Смените наконечник пипетки.
5. Повторите этап 4 для других предварительно обработанных образцов и контролей. Используйте новую лунку ряда А и меняйте наконечники пипетки для каждого образца или контроля.
6. Включите таймер. Инкубируйте 10 минут.

Реакция Антиген-Антитело (Ряд А).

7.
 - a. Вставьте Гребень (печатной стороной к себе) в лунки ряда А, содержащего образцы и контроля. **Перемешивание:** Вынимайте и снова вставляйте 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. Через 30 минут извлеките Гребень из лунок ряда А. **Удалите оставшуюся жидкость с заостренных концов зубцов Гребня** при помощи фильтровальной бумаги. Не касайтесь фронтальной поверхности зубцов.

Первая промывка (Ряд В).

8. Введите 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 7с.

Связывание с Конъюгатом (Ряд С).

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

Вторая промывка (Ряд D).

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

Третья промывка (Ряд E).

11. 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).

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

Остановка реакции (Ряд E).

13. 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 можно хранить для дальнейшего применения:

- Заклейте использованные лунки широкой клейкой лентой, во избежание пролития их содержимого, в случае опрокидывания Проявочной ванны.

Другие компоненты набора

- Верните оставшиеся Проявочные ванны, Гребни, перфоратор, контроли, очищающий раствор и инструкции обратно в оригинальную коробку 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

Качественная интерпретация результатов

Визуальная интерпретация

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** IgM антител к CMV.
- **Отсутствие** точки или точка с меньшей интенсивностью окрашивания, чем точка Положительного Контроля интерпретируется как **отсутствие** IgM антител к CMV (Отрицательный результат).



Рис. 6 Результаты теста

Документация результатов

Так как окраска точек стабильна, Гребни можно хранить в качестве 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.

Трудности в интерпретации результатов могут возникнуть в следующих случаях:

- Могут встречаться первичные инфекции CMV без обнаружимого присутствия IgM антител.
- IgM антитела могут присутствовать в организме на протяжении длительного времени и указывают на

иммунологическую реактивацию, связанную с повторным заражением.

- Некоторые трудности также возможны при установлении диагноза новорожденным, пациентам с нарушенной иммунной системой, а также в случаях переливания крови.
- Инфекция вирусом Эпштейна-Барра (EBV) может способствовать реактивации IgM антител.

Таким образом, для постановки диагноза пациента рекомендуется проведение повторного тестирования от 2 до 4 раз с интервалом 2-4 недели, в совокупности с результатами серологических исследований на IgG антитела к CMV.

Показатели качества теста *

Чувствительность и специфичность тест-системы ImmunoComb® II CMV IgM была оценена в нескольких референс-лабораториях на 498 образцах, в сравнении с ИФА референс-методом. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты испытаний

Контрольный метод	ImmunoComb® II CMV IgM	
	Положительный	Отрицательный
Положительный	163	2
Отрицательный	6	327

Следующие показатели качества были вычислены исходя из этих результатов:

- Чувствительность — 98.8 %
- Специфичность — 98.2 %

Повторяемость

Произвольно было выбрано 10 Гребней из разных наборов одной серии. Одна сыворотка положительная по IgM антителам к CMV была проверена 12 раз на каждом из выбранных Гребней. Во всех случаях были получены положительные результаты.

Воспроизводимость

2 положительных образца были проверены на Гребнях 3 различных серий. Каждый образец был протестирован несколько раз. Во всех случаях были получены положительные результаты.

Перекрестные реакции

Перекрестные реакции образцов положительных по CMV IgG были незначительными. Перекрестные реакции с образцами, положительными по другим герпесвирусам таким как Varicella-zona, EBV, ANA, HSV также были незначительными. Не исключается незначительное взаимодействие с сыворотками от беременных женщин, а также пациентов положительных по ревматоидному фактору (RF).

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

1. **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.
2. **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.
3. **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.
4. **Griffiths, P., Emery, V.** 1997. Cytomegalovirus. *In*: Clinical virology. New York, NY: Churchill, Livingstone. p. 445-470.
5. **Laing, R.B., Brettell, R.P., Leen, C.L.** 1997. Effect of CMV serology and CMV disease on AIDS morbidity and mortality. *Infection*. 25(4): p. 255.
6. **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.
7. **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.

* Подробные данные предоставляются по требованию.

8. **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.


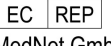
Условные обозначения

	Гребень
	Проявочная ванна
	Положительный контроль
	Отрицательный контроль
	Перфоратор
	Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
	Внимание, посмотрите сопроводительные документы
	Изделие медицинского назначения для диагностики in vitro
	Ограничения температуры
	Содержимого достаточно для 36 тестов
	Производитель
	Уполномоченный представитель в ЕС
	Каталожный номер
	Очищающий раствор
	Серия
	Срок годности: год-месяц-число
	Серийный номер

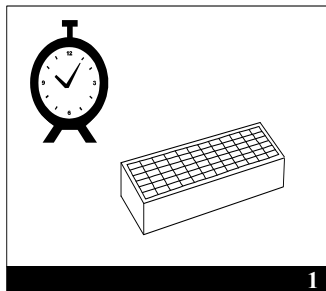
Эксклюзивный дистрибьютор в Российской Федерации ЗАО «Биоград»

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

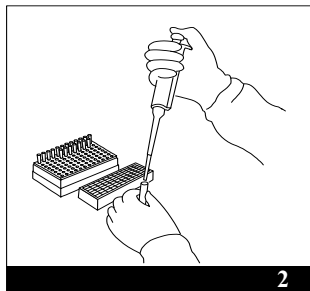
inverness medical innovations

 Orgenics Ltd., P.O.B. 360, Yavne 70650, Israel Tel: + 972 8 942 92 01 Fax: + 972 8 943 87 58 <small>©2008 Inverness Medical. All rights reserved</small>	 MedNet GmbH Borkstrasse 10 48163 Muenster - Germany Tel: + 49 251 32266-0 Fax: + 49 251 32266-22
	Version: 60461002/R4/OR/CE (03/2009)

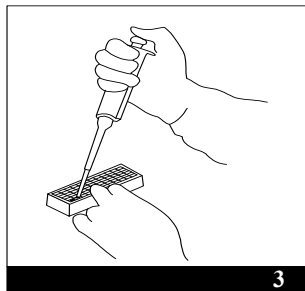
Описание основных этапов анализа



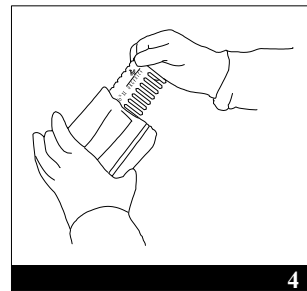
1
Подготовка Проявочной ванны: выдержать 3 часа при комнатной температуре; или 20 мин. при 37°C



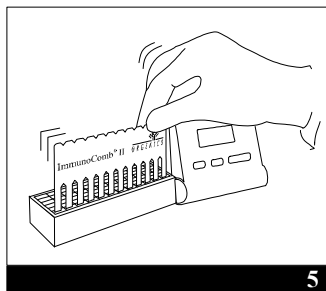
2
Забор и предварительная обработка образцов и контролей



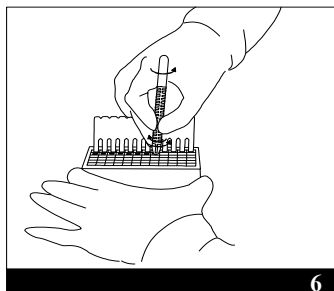
3
Добавление предварительно обработанных образцов и контролей в лунки ряда А. Перемешивание и инкубация.



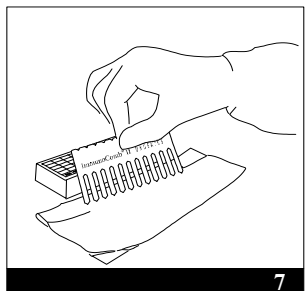
4
Извлечение Гребня из упаковки



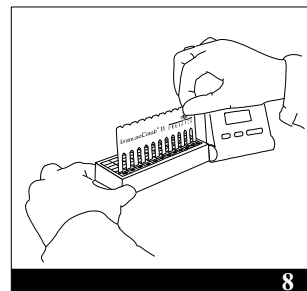
5
Введение Гребня в лунки ряда А. Инкубация



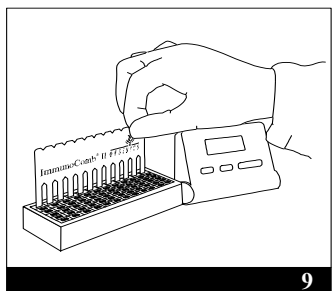
6
Вскрытие лунок ряда В перфоратором



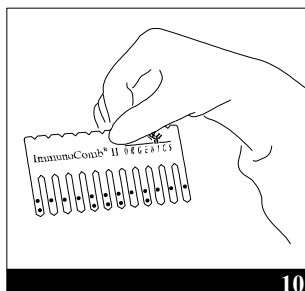
7
Удаление капель жидкости с концов зубцов Гребня



8
Введение Гребня в лунки ряда В. Перемешивание. Инкубация



9
Цветная реакция в ряду F



10
Результаты

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

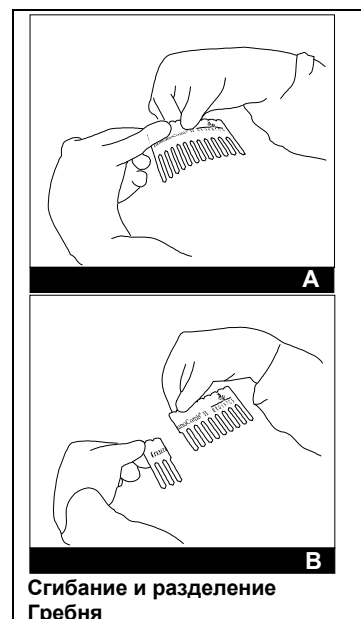
Краткое руководство по проведению анализов

Прилагаемая краткая инструкция предназначена для опытных пользователей набора ImmunoComb® II CMV IgM (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. Внесите по 25 мкл каждого образца и контроля в микропипетки или лунки микротитратора, смешайте со 100 мкл очищающего раствора и инкубируйте на протяжении 10 минут.
3. Внесите по 25 мкл каждого предварительно обработанного образца и контроля в лунки ряда А Проявочной ванны. Перемешайте и инкубируйте на протяжении 10 минут.
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	Прополощите; инкубация 2 мин. ; удалите капли
Связывание с конъюгатом	С	Перемешайте; инкубация 20 мин. ; удалите капли
Промывка	D	Прополощите; инкубация 2 мин. ; удалите капли
Промывка	E	Прополощите; инкубация 2 мин. ; удалите капли
Окрашивание	F	Перемешайте; инкубация 10 мин. ;
Остановка реакции	E	Инкубация 1 мин. ; сушка на воздухе



Сгибание и разделение Гребня