

НАБОР ИФА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К ВИРУСУ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 2 ТИПА

EIA-1794, HSV 2 IgM ELISA

Каталог. № : **EIA-1794**
Количество : **96**
Производитель: **DRG, (США)**

Методика от **24-10-2011**
Версия **3.0**



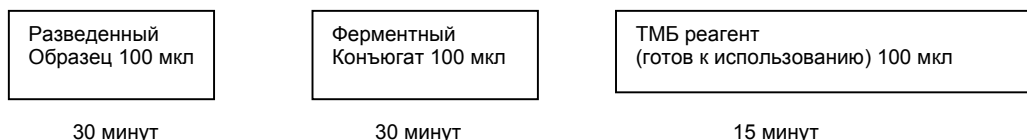
Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Только для использования в in-Vitro диагностике.

Хранить при температуре 2-8 °С.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разведение образцов 1:40
5 мкл/200 мкл
2. Три инкубации при 37°С.



3. Остановить реакцию с помощью 100 мкл кислоты. Считать ОП при 450 нм.

НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

HSV-2 IgM ELISA используется для определения антител IgM к простому вирусу герпеса (далее по тексту - HSV-2.)

ВВЕДЕНИЕ

HSV – это распространенный патогенный микроорганизм и его первичная инфекция как правило бессимптомна. Существуют две разновидности HSV: тип 1 и тип 2. HSV-1 обычно ассоциируется с оральными инфекциями и поражениями верхней части тела, HSV-2 ассоциируется с генитальными инфекциями и поражениями нижней части тела. Клинические случаи включают (1) герпетоформную экзему с экзематозными изменениями кожи с многочисленными поражениями, (2) гингивостоматит, и (3) герпесный сепсис (встречается только у недоношенных новорожденных детей). HSV-2 IgM ELISA – это точный серологический метод определения IgM специфичных антител HSV-2, в образцах сыворотки.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Очищенный антиген HSV-2 нанесен на поверхность микролунок. Разведенные образцы сыворотки добавляются в лунки, и антитело HSV-2 специфичное к IgM, если присутствует, связывается с антигеном. Все несвязанные вещества удаляются при промывке. Добавляется конъюгат пероксидазы хрена, который связывается с комплексом антиген-антитело. Избыточный конъюгат пероксидазы хрена вымывается, после чего добавляется раствор ТМБ реагента. В определенное время каталитическая реакция ферментного конъюгата должна быть остановлена. Интенсивность полученного окрашивания пропорциональна количеству в образце антител HSV-2 специфичных к IgM. Результаты считываются с помощью микропланшетного ридера параллельно с калибратором и контролями.

РЕАГЕНТЫ

В состав набора входят:

- Микротитровальные лунки: покрыты очищенным антигеном HSV-2 (12 x 8 лунок).
- Ферментный конъюгат (красный): 1 флакон (12 мл).
- Раствор для разведения образцов (синий): 1 флакон (22 мл).
- Отрицательный контроль: Диапазон указан на этикетке. Бесцветный колпачок (100 мкл/флакон).
- Калибратор Cut-off: желтый колпачок. HSV-2 IgM Индекс = 1 (100 мкл/флакон).
- Положительный контроль: Диапазон указан на этикетке. Красный колпачок. (100 мкл/флакон).
- Концентрированный буферный раствор для промывки (20x): 1 флакон (50 мл).
- ТМБ Реагент (готов к использованию): 1 флакон (11 мл).
- Стоп-раствор (1N HCl): бесцветный колпачок. 1 флакон (11 мл).

Требуемые, но не поставляемые материалы:

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Точные пипетки: 5 мкл, 100 мкл, и 200 мкл
- Одноразовые наконечники
- Контейнер: 1 литр
- Микропланшетный считыватель с длиной волны 450 нм
- Воротковый миксер или аналог

- Впитывающая бумага

ХРАНЕНИЕ НАБОРА И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

1. Хранить набор при 2-8 °С.
2. Хранить лунки в герметичной упаковке с влагопоглотителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности.
4. Во время использования или хранения не подвергать реагенты набора воздействию тепла, солнца или яркого света.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Потенциально биологически опасные вещества: Калибраторы и контроли содержат компоненты человеческого происхождения, предварительно протестированные, и показавшие отсутствие реакции на поверхностные антигены гепатита В, а так же на антитела ВИЧ при взаимодействии с реагентами разрешенными FDA. Однако, т.к. не существует метода анализа, дающего полную уверенность в отсутствии веществ содержащих ВИЧ или вирус гепатита В, с этими реагентами следует обращаться в соответствии с уровнем безопасности 2, как рекомендуется в Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories." 1984
2. Не использовать реагенты после окончания срока годности. Не смешивать компоненты из разных лотов.
3. Не использовать реагенты, если они мутные или подозревается загрязнение.
4. Не использовать реагент, если пробирка повреждена.
5. Реагенты закрыть немедленно после использования. Не менять крышки на флаконах.
6. Каждая лунка может использоваться только один раз.
7. Не пипетировать реагенты ртом.
8. Компоненты, содержащие азид натрия, не использовать в ферментных реакциях.
9. Избегать контакта с 1N HCl. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги. Промыть с большим количеством воды.
10. Данный набор предназначен для диагностики in vitro.

ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

1. Использование образцов сыворотки требуется для этого теста.
2. Образцы должны быть собраны с использованием стандартных методов венепункции. Отделить сыворотку от коагулированных клеток в течение 60 минут после сбора.
3. Образцы можно хранить при температуре 2-8 °С в течение до 7 дней или заморозить на срок до 6 месяцев. Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов сыворотки.
4. Избегайте сильно гемолитических (ярко-красный), липемических или мутных образцов (после центрифугирования).

Особенности проведения

1. Рекомендации по пипетированию (одно- и многоканальные): Пипетирование всех стандартов, образцов и контролей должно быть завершено в течение 3 минут.
2. Все стандарты, образцы и контроли следует тестировать в дубликаты, чтобы все условия тестирования были одинаковыми.
3. Рекомендуется считать результаты в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Все реагенты привести к комнатной температуре (20-25 °С) перед использованием.
2. Развести 1 объем промывочного буфера (20x) с 19 объемами дистиллированной воды. Например, развести 50 мл промывочного буфера (20x) дистиллированной водой до 1000 мл промывочного буфера (1x). Промывочный буфер стабилен в течение 1 месяца при температуре 2-8°С. Хорошо смешать перед использованием.

ПРИБОРЫ

Микропланшетный ридер с шириной дорожки 10 нм или меньше и оптической плотностью от 0 до 3 OD или больше при длине волны 450 нм является приемлемым для измерения абсорбции.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместить в держатель требуемое количество лунок.
 2. Приготовить 1:40 раствор тестируемых образцов, отрицательный контроль, положительный контроль, калибратор, добавив 5 мкл образца к 200 мкл раствора для разведения образцов. Хорошо смешать.
 3. Раскапать 100 мкл разведенной сыворотки, калибратора и контролей в соответствующие лунки. В лунку реагента Бланк 1А добавить 100 мкл раствора для разведения образцов. Постучать по держателю, чтобы удалить пузырьки из жидкости и хорошо смешать.
 4. Инкубировать при 37°С в течение 30 минут.
 5. В конце инкубации удалить жидкость из всех лунок. Промыть и вылить содержимое микротитровальных лунок 4 раза разведенным промывочным буферным раствором (1x) и затем 1 раз дистиллированной водой.
 6. Раскапать по 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку. Осторожно смешивать в течение 10 секунд.
 7. Инкубировать при 37 °С в течение 30 минут.
 8. В конце инкубации удалить конъюгат из всех лунок. Промыть и вылить содержимое микротитровальных лунок 4 раза разведенным промывочным буферным раствором (1x) и затем 1 раз дистиллированной водой.
 9. Раскапать по 100 мкл ТМБ реагента в каждую лунку. Осторожно смешивать в течение 10 секунд.
 10. Инкубировать при 37 °С в течение 15 минут.
 11. Добавить 100 мкл стоп-раствора (1N HCl) чтобы прекратить реакцию.
 12. Осторожно смешивать в течение 30 секунд. **Важно удостовериться, что синее окрашивание полностью сменяется желтым.**
- Примечание: Перед считыванием в лунках не должно быть пузырьков воздуха!**
13. Снимать показания по оптической плотности (ОП) при 450 нм в течение 15 минут с помощью микротитровального ридера.

ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Подсчитать среднее значение дубликатов калибратора (xc).
2. Подсчитать среднее значение дубликатов положительного контроля (xp), отрицательного контроля (xn) и образцов пациентов (xs).
3. Подсчитать коэффициент IgM HSV-2 для каждого определения, разделив средние значения каждого образца (x) на среднее значение калибратора, (xc).

Пример: Примечание: значения приведены только в качестве иллюстрации и не должны использоваться для подсчета неизвестных. Каждый пользователь должен получить свои данные.

Cut-off Calibrator HSV-2 IgM Index = 1.0

1. ОП калибратора = 1.010, 1.017 xc = 1.014
 2. ОП отрицательного контроля = 0.048, 0.047 xp = 0.048
 IgM Коэффициент HSV-2 = xp / xc = 0.048/1.014=0.05
 3. ОП положительного контроля = 1.514, 1.667 xr = 1.591
 IgM коэффициент HSV-2 = xr / xc = 1.591/ 1.014 = 1.57
 4. ОП образца пациента = 1.870,1.871 xs = 1.871
 IgM коэффициент HSV-2 = xs / xc = 1.871 / 1.014 = 1.85

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Анализ проведен правильно, если соблюдались следующие условия:

1. значение ОП заготовки реагента по отношению к воздуху микротитровального ридера должно быть менее 0,250.
2. Если значение ОП калибратора Cut-off меньше 0,250 тест необходимо повторить.
3. Коэффициент IgM отрицательного или положительного контроля должен находиться в пределах, установленных в Сертификате качества.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Отрицательный рез-т: HSV-2 IgM коэффициент менее 0.90.

Сомнительный: HSV-2 IgM коэффициент между 0.91-0.99.

Повторить анализ.

Положительный: HSV-2 IgM коэффициент 1.00 или более.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

I. Специфичность и чувствительность:

образцы 94 пациентов использовались для определения специфичности и чувствительности методики. Результаты анализа HSV-2 IgM ELISA сравнивались с результатами коммерческого ELISA – набора:

		Reference HSV-2 IgM ELISA			
		N	E	P	Total
HSV-2 IgM ELISA	N	51(D)	0	3(B)	54
	E	0	0	0	0
	P	2(C)	0	38(A)	40
Total		53	0	41	94

Чувствительность = A / (A+B) = 38 / 41 = 92.7%

Специфичность = D / (C+D) = 51 / 53 = 96.2%

Точность = (A+D) / (A+B+C+D) = 89 / 94 = 94.7%

II. Точность:

Исследование было проведено для определения точности анализа. Среднее значение, SD, и % CV были рассчитаны для анализа внутри- и между сериями в единицах ОП (A₄₅₀).

a. Точность внутри анализа

В следующей таблице представлен краткий отчет о результатах анализа четырех (4) образцов, индивидуально пипетированных в группы из двадцати четырех (24) в одном анализе.

SERUM SAMPLE	INTRA-ASSAY			
	MEAN (O.D. A ₄₅₀)	S.D.	% C.V.	N
1	1.533	0.059	3.8	24
2	1.068	0.019	1.8	24
3	0.500	0.014	2.7	24
4	0.246	0.023	9.2	24

b. Точность между сериями

В следующей таблице представлены данные точности межсерийных определений в репликах четырех (4) образцов, индивидуально пипетированных в группы по пять (5).

SERUM SAMPLE	INTER-ASSAY			
	MEAN (O.D. A ₄₅₀)	S.D.	% C.V.	N
1	1.474	0.082	5.6	20
2	1.015	0.039	3.8	20
3	0.544	0.018	3.3	20
4	0.282	0.014	4.9	20

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Надежные и соответствующие результаты будут получены, когда процедура анализа осуществляется с полным пониманием инструкции и с соблюдением надлежащей лабораторной практики.
2. Процедура промывки является критической. Недостаточная промывка приводит к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.
3. Образцы сыворотки, демонстрирующие липемию, гемолиз или мутность, не должны использоваться с этим тестом.
4. Как и в других серологических анализах, результаты должны использоваться в сочетании с клинической картиной и другими диагностическими методами.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com