

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К ВИРУСУ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1 И 2 ТИПА (ВПГ-1+2)

EIA-3490, HSV-1+2 IgM ELISA

Каталог. № : EIA-3490
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 11-2013
Версия 12.0



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

1. ВВЕДЕНИЕ

Иммуноферментный анализ для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM ВПГ-1,2 в сыворотке и плазме человека.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG Herpes simplex Virus Type 1+2 IgM ELISA - это набор для детекции антител класса IgM к ВПГ-1,2 в сыворотке и плазме человека.

Образцы сыворотки пациента необходимо развести раствором для разведения IgM образцов, содержащим человеческие антитела класса IgG чтобы избежать подавления специфическими IgG и устранить ревматоидный фактор.

Микротитровальные стрипованные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигенами ВПГ-1,2. Разведенные образцы пациента и готовые к использованию контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфичные к ВПГ-1,2 антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляются антитела IgM, конъюгированные пероксидазой хрена. Во время второй инкубации этот анти-IgM конъюгат связывается только с антителами IgM, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями.

После второй промывки (для удаления несвязанного конъюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции.

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgM специфичных к ВПГ-1,2. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA - считывателе.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для использования в диагностике in vitro.
- Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ-1,2, поверхностному антигену гепатита В и вирусу гепатита С. Однако, во время использования и уничтожения все реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные.
- Контроли и стандарты в культурах клеток оказались неинфекционными.
- Избегайте контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 моль/л H₂SO₄. Он может вызывать раздражение кожи и ожоги.
- Никогда не раскапывайте рот и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курите, не принимайте пищу, не пейте и не наносите косметику на территории, где обрабатываются образцы или реагенты набора.
- Надевайте одноразовые перчатки из латекса при обработке образцов и реагентов. Микробиологическое заражение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.
- Обращение должно соответствовать процедурам, указанным в соответствующих государственных руководствах или правилах по биологической безопасности.
- Не используйте реагенты после даты истечения срока годности, которая указана на этикетках набора.

- Согласно протоколу анализа необходимо следовать всем рабочим объемам реагентов.
- Использование калиброванных пипеток и считывающих устройств пластины микротитратора. Оптимальные результаты анализа можно получить только при использовании откалиброванных дозаторов и микротитровальных планшетных считывателей.
- Не смешивайте и не используйте компоненты наборов с различными номерами партий. Рекомендуется не заменять лунки различных планшетов, даже одной и той же партии. Возможно, что наборы поставлялись и хранились в различных условиях, и связывающие качества планшетов могут в некоторой степени отличаться.
- Исходя из соответствующих государственных руководств или правил по биологической безопасности, химические вещества, и подготовленные или использованные реагенты должны рассматриваться как опасные отходы.
- За информацией относительно опасных веществ, входящих в набор, просьба обращаться к Спецификациям Безопасности Материала. Спецификации Безопасности Материала предоставляются по запросу непосредственно от компании DRG Instruments GmbH. Спецификации Безопасности Материала соответствуют требованиям ЕС-Руководства 91/155 ЕС.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки**, 12 x 8 (делимые) полоски, 96 лунок;
Лунки покрыты антигеном ВПГ-1,2 (вкл. 1 держатель для полосок и 1 пленку для накрывания).
2. **Раствор для разбавления образцов***, 1 флакон, 100 мл, готов к использованию, желтого цвета; pH 7.2 ± 0.2.
3. **IgG-RF-сорбент***, 1 флакон, 6,5 мл, готов к использованию; желтого цвета. Содержит анти-человеческие антитела класса IgG.
4. **Положительный контроль***, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использованию, желтого цвета, красный колпачок.
5. **Отрицательный контроль***, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использованию, желтого цвета, желтый колпачок.
6. **Cut-off контроль***, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использованию, желтого цвета, черный колпачок.
7. **Ферментный конъюгат***, 1 флакон, 20 мл готов к использованию, красного цвета, антитела к человеческому IgM, конъюгированные с пероксидазой хрена.
8. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл готов к использованию, ТМБ.
9. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл готов к использованию, содержит 0,2 моль/л H₂SO₄. Избегайте контакта со стоп раствором. Он может вызвать раздражения кожи и ожоги.
10. **Промывочный раствор***, 1 флакон, 30 мл (концентрация 20x для 600 мл); pH 6.5 ± 0.1 см. „Подготовка реагентов“.
*⇒ содержит безртутный консервант

4.1.1 Необходимые но не поставляемые материалы

- Микротитровальный планшетный откалиброванный считыватель (450/620нм +/- 10нм).
- Откалиброванные микропипетки разного объема.
- Инкубатор на 37°C.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Вихревой трубочный смеситель.
- Деионизированная или (только что) дистиллированная вода.
- Таймер.
- Промокательная бумага.

4.2 Хранение и стабильность набора

При температуре хранения от 2 до 8 °C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты не использовать. Открытые реагенты должны храниться при 2-8 °C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2-8 °C. Как только пакет из фольги был открыт, следует быть внимательным чтобы его снова плотно закрыть. Вскрытые наборы сохраняют активность в течение 2 месяцев при соблюдении вышеуказанных условий хранения.

4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием приведите все реагенты и необходимое количество полосок к комнатной температуре.

Промывочный раствор

Разбавить промывочный раствор 1+19 (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистиллированной водой.

Потребление: ~5 мл на определение.

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °С на водяной бане.

Разбавленный промывочный раствор стабилен в течение 4 недель при 2-8 °С.

4.4 Уничтожение набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с государственными правилами. Специальная информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в данной инструкции).

4.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Сильно поврежденные отдельные компоненты не должны использоваться в анализе. Они должны храниться до достижения окончательного решения. После этого они должны быть уничтожены согласно официальным правилам.

5. ОБРАЗЦЫ

В данном исследовании может использоваться сыворотка или плазма.

Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь венопункцией (например, Sarstedt Monovette для сыворотки), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре. Не центрифугировать, пока не произошло полное свертывание. Для пациентов, проходящих антикоагуляционную терапию, может потребоваться больше времени для свертывания.

Плазма:

Собрать цельную кровь в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт и немедленно центрифугировать.

5.2 Хранение образцов

Перед исследованием образцы должны храниться накрытыми до 3 дней при температуре 2-8 °С. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20 °С. Оттаявшие образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

5.3 Разведение образцов

Перед анализом каждый образец пациента сначала следует разбавить *Раствором для Разбавления Образцов*. Для абсорбции ревматоидного фактора эти предварительно разбавленные образцы затем должны инкубироваться вместе с *IgG-RF-сорбентом*.

1. Разбавить каждый образец пациента **1+50 Раствором для Разбавления Образцов**; напр., 10 мкл образца + 0,5 мл *Раствора для Разбавления. Хорошо смешать.*
2. Разбавить этот предварительно разбавленный образец **1+1 IgG-RF-сорбентом** напр., 60 мкл предварительно разбавленного образца + 60 мкл *IgG-RF-сорбента. Хорошо смешать.*
3. **Оставить по крайней мере на 15 минут при КТ и хорошо перемешать снова (или на ночь при 2-8 °С) и снова хорошо перемешать.**
4. Взять 100 мкл этих предварительно обработанных образцов для ИФА.

Внимание: Контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- Внимательно прочитайте протокол перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от четкого следования описанному протоколу анализа.
- **Очень важно перед началом процедуры анализа все реагенты, образцы и контроли довести до комнатной температуры.**
- Как только начался анализ, все этапы должны быть завершены без прерывания.
- Во избежание перекрестного загрязнения, используйте новые одноразовые пластмассовые наконечники для каждого стандарта, контроля или образца.
- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, снять крышки, установить лунки в

рамку и т.д. Это обеспечит равномерное распределение времени для каждого этапа пипетирования без остановки.

- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.
- Чтобы избежать испарения и микробиологического загрязнения, плотно закройте флаконы с реагентами непосредственно после их использования.
- После первого вскрытия и последующего хранения проверьте конъюгат и флаконы контролей на микробиологическое загрязнение для дальнейшего использования.
- Во избежание перекрестного загрязнения и ошибочно высоких результатов, раскапывайте образцы пациентов и распределяйте конъюгат на дно лунок аккуратно без разбрызгивания.
- Во время инкубации накрывайте микротитровальные полоски фольгой, чтобы избежать испарения.

6.2 Процедура анализа

Перед началом проведения анализа необходимо разбавить промывочный раствор; **приготовьте образцы пациентов как описано в п. 5.3** и осторожно составьте для всех образцов и контролей **план распределения и идентификации**, вложенный в набор.

1. Отобрать требуемое количество микротитровальных полосок или лунок и поместить их в держатель.
Разместите, по крайней мере:

1 лунку	(напр., A1)	для бланка субстрата,
1 лунку	(напр., B1)	для отрицательного контроля,
2 лунки	(напр., C1+D1)	для Cut-off контроля и
1 лунку	(напр., E1)	для положительного контроля.

На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.

2. Раскапать:

100 мкл	<i>Отрицательного Контроля</i>	в лунку B1
100 мкл	<i>Cut-off контроля</i>	в лунки C1 и D1
100 мкл	<i>Положительного Контроля</i>	в лунку E1 и
100 мкл	каждого предварительно обработанного образца <u>новыми одноразовыми наконечниками</u>	в соответствующие лунки. Оставить лунку A1 для бланка субстрата!
3. Накрыть лунки пленкой, поставляемой в наборе. Инкубировать: **60 минут при 37 °С.**
4. Резко вытряхните содержимое лунок.
Промойте их **5 раз** разбавленным *Промывочным Раствором (300 мкл/лунку)*. Резко вытряхните лунки на промокательную бумагу, чтобы удалить остатки жидкости.
Примечание: Чувствительность и точность данного анализа в значительной мере зависят от правильности исполнения процедуры промывки!
5. Раскапать **100 мкл Ферментного Конъюгата** во все лунки, **кроме A1.**
6. Инкубировать **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °С). Не подвергать воздействию прямого солнечного света!**
7. Резко вытряхните содержимое лунок.
Промойте их **5 раз** разбавленным *Промывочным Раствором (300 мкл/лунку)*. Резко вытряхните лунки на промокательную бумагу, чтобы удалить остатки жидкости.
8. Раскапать **100 мкл Раствора Субстрата во все** лунки.
9. Накрыть лунки фольгой. Инкубировать **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ÷ 25 °С) в темноте.**
10. Остановить ферментную реакцию путем внесения **100 мкл Стоп-Раствора в каждую** лунку. Любое голубое окрашивание, проявившееся во время инкубации, переходит в желтое.
Примечание: высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!
11. Читать оптическую плотность при **450/620 нм** с помощью микровального планшетного считывателя в течение **30 минут** после внесения *Стоп-Раствора*.

6.3 Измерение

Настроить микропланшетный считыватель для ELISA на нуль, используя **бланк субстрата в лунке A1.**

Если по техническим причинам ELISA считыватель не может быть настроен на нуль используя бланк субстрата в лунке A1, чтобы получить надежные результаты, вычитайте значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции.

Измерить абсорбцию во всех лунках при 450 нм и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в план.

Рекомендуется использовать для считывания двойную длину волны как референтную на 620 нм. Где применимо, рассчитать средние значения абсорбции всех дублей.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Надежность процесса анализа

Постановка анализа может считаться действительной при соблюдении следующих условий:

Бланк субстрата в А1:	значение абсорбции	менее 0.100.
Отриц. контроль в В1:	значение абсорбции	менее 0.200.
Cut-off контроль (СО) в С1/D1:	значение абсорбции	между 0.350-0.850.
Положит. контроль в Е1:	значение абсорбции	между 0.650-3.000.

7.2 Вычисление

Среднее значение абсорбции cut-off контроля (СО)

Рассчитать среднее значение абсорбции 2 определений негативных контролей (напр., в С1/D1).

Пример: $(0.59 + 0.61) \div 2 = 0.60 = СО$

7.3 Интерпретация ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ

Средние значения абсорбции образцов пациента более чем на 10 % выше СО (Средняя ОП_{пациента} > 1.1 x СО)

СЕРАЯ ЗОНА

(Средние) значения абсорбции пациентов от 10 % выше до 10 % ниже СО
повторить анализ 2 - 4 недели спустя на новых образцах пациентов
($0.9 \times СО \leq \text{Средняя ОП}_{\text{пациент}} \leq 1.1 \times СО$)
Результат второго анализа опять в «серой зоне» ⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ**

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

(Средние) значения абсорбции пациента более чем на 10 % ниже СО (Средняя ОП_{пациент} < 0.9 x СО)

7.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

Среднее значение абсорбции пациента $\times 10 \frac{СО}{0.60} = [DRG \text{ UNITS} = DU]$
1.580 x 10 = 26 DU

Интерпретация результатов

Значение Cut-off:	10	DU
Серая зона:	9 - 11	DU
Отрицательный:	< 9	DU
Положительный:	> 11	DU

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно местному законодательству. Использование контрольных образцов рекомендуется для подтверждения достоверности результатов каждый день. Используйте контроли здоровых и патологических уровней.

Также рекомендуется заимствовать информацию из национальных или международных программ Подтверждения качества, для того чтобы быть уверенным в точности результатов.

Если результаты анализа вне принятых уровней контрольных материалов, их нужно считать не действительными.

В этом случаи, пожалуйста, проверите следующее: оборудование для раскапывания и установки времени; фотометр; даты истечения срока годности реагентов, условия хранения и инкубации; методы аспирации и промывания.

После проверки выше указанного и в случае если ошибка не была обнаружена, свяжитесь со своим дистрибьютором или производителем.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяется как вероятность получения негативного результата при отсутствии специфического анализата.

Составила 100 %.

9.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется как вероятность получения позитивного результата при присутствии специфического анализата.

Составила 100 %.

9.3 Сравнение методов

Данный метод сравнивался с методом Virion-Serion HSV 1+2 IgM ELISA. Использовались 73 образца.

n=73	Virion-Serion ELISA	
	Положит.	Отрицат.
DRG ELISA лот 1	57	0
	0	16

Согласованность: 100 %

9.4 Точность

9.4.1 Точность внутри анализа определялась анализом 3 положительных образцов x 20.

Образец	Среднее OD	CV (%)	n
1	0.79	6.69	20
2	1.18	4.36	20
3	1.44	3.98	20

9.4.2 Точность между анализами определялась с использованием cut-off контроля, положительного контроля и 3 с 2 наборами в 10 независимых исследованиях в дублях.

Образец	Среднее OD	CV (%)	n
1	0.78	12.81	40
2	1.12	11.87	40
3	1.45	7.41	40

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Бактериологическое заражение или повторные циклы замораживания/размораживания образцов может повлиять на значения абсорбции. Только у иммунокомпromиссных пациентов и новорожденных серологические данные имеют ограниченные значения.

10.1 Интерферирующие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0.50 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на проведение анализа.

11. ЮРИДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться согласно инструкции производителя. Более того, потребитель должен точно соблюдать все правила профессиональной лабораторной практики или другие соответствующие национальные стандарты и/или законы. Это особенно относится к контрольным реагентам. В процессе проведения анализа важно включать достаточное количество контролей для оценки точности теста. Результаты теста действительны, только если они отвечают нормам и если все параметры теста отвечают спецификации теста. В случае любого сомнения свяжитесь с производителем.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения не должны базироваться только на результатах лабораторных исследований, даже если они считаются достоверными согласно п. 11.1. Любой результат является только частью общей клинической картины пациента.

Диагностика инфекционного заболевания не может устанавливаться только на основе единственного результата анализа. Точная диагностика должна учитывать всю клиническую картину пациента (историю, симптомы, сыровоточные данные). Только в случаях, когда лабораторные результаты совпадают с нормами и общей картиной пациента, можно делать терапевтическое заключение. Только результаты этого теста не могут быть основой для терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и/или замена или компонентов разных лотов с одного набора или с другого может негативно влиять на результаты и весь тест. Такая замена не может быть основой для претензий или просьбы о замене набора.

Претензии в случаях неправильного использования набора лабораторией исходя из п. 11.2 тоже не могут являться действительными. Не смотря на это, в случае любой претензии, в производитель обязывается не повышать значения набора. Производитель не несет ответственности за любое повреждение набора, случившееся вследствие его неправильной транспортировки.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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