



Набор ИФА

Для определения антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1 и 2 типа (ВПГ-1+2)

Каталог. № : EIA-3489
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 07-2009

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на английском языке.

1. ВВЕДЕНИЕ

Набор DRG Herpes Simplex Virus Type 1+2 IgG ELISA предоставляет материалы для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к ВПГ-1,2 в сыворотке человека.

Данный анализ предназначен только для диагностического использования *in vitro*.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG Herpes Simplex Virus Type 1+2 IgG ELISA является твердофазным иммуоферментным анализом (ELISA).

Микротитровальные 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 IgG, конъюгированные пероксидазой хрена. Во время второй инкубации этот анти-IgG конъюгат связывается только с антителами IgG, 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 данного окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgG 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 1/2б 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 ротом 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 протокола 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 планшеточных 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. 12x8 Микротитровальные лунки ВПГ-1,2 (IgM)
8 - луночные делимые лунки покрытые антигенами ВПГ-1,2 + 1 держатель и 2 пленки для накрывания
2. 100 мл Раствор для разбавления образцов ***, 1 флакон. Готов к использ., желтого цвета, pH 7.2 ± 0.2.
3. 1 мл ВПГ-1,2 IgM положительный контроль***, 1 флакон. Готов к использ., желтого цвета, красный колпачок.
4. 2 мл ВПГ-1,2 IgM отрицательный контроль ***, 1 флакон. Готов к использованию, желтого цвета, желтый колпачок.
5. 2 мл Cut-off контроль***, 1 флакон. Готов к использованию, желтого цвета, черный колпачок.
6. 20 мл Ферментный конъюгат**, 1 флакон. Готов к использованию, красного цвета; антитела к человеческому IgM конъюгированные пероксидазой хрена.
7. 14 мл Раствор субстрата, 1 флакон, готов к использ., ТМБ.
8. 14 мл Стоп-раствор, 1 флакон, готов к использ., содержит 0,5 моль/л H₂SO₄.

Избегайте контакта со стоп раствором. От может вызвать раздражения кожи и ожоги.

9. 30 мл Промывочный раствор, 1 флакон (20x концентрат для 600 мл; pH 7.2 ± 0.2. см. «Подготовка реагентов».

*⇒ содержит 0.03 % ProClin 300

**⇒ содержит 0.3 % ProClin 300+0.01 % гентамицина сульфата

***⇒ содержит 0.03 % ProClin 300+0.015 % 5-бромо-5-нитро-1.3-диоксан (BND) + 0.010 % 2-метил-2Н-изотиазол-3-один (MIT).

4.1.1 Необходимые но не поставляемые материалы

- Микротитрационный откалиброванный планшет-ридер (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 4 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 течении 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. Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре.

5.2 Хранение образцов

Перед исследованием образцы должны храниться накрытыми в течение 24 часов 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 разбавить сначала каждый образец пациента разбавителем образца 1+100, напр., 10 мкл образца + 1 мл раствора для разбавления образца (хорошо смешать, оставить по крайней мере на 15 минут и снова хорошо перемешать).

Примечание: 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 pipетирования 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 меньшей мере:

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

На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.

2. Раскапать:

100 мкл отрицательного контроля в лунки B1,

100 мкл "cut-off" контроля в лунки C1+D1,

100 мкл положительного контроля в лунку E1 и

100 мкл образца пациента с **новыми одноразовыми наконечниками** в оставшиеся лунки согласно схеме. Оставить лунку A1 для бланка субстрата!

3. Накрывать лунки пленкой поставляемой в наборе. Инкубировать: **1 час при 37 °С.**

4. Резко вытряхните содержимое лунок.

Промойте их **5 раз** разбавленным *промывочным раствором (300 мкл/лунку)*. Резко вытряхните лунки на абсорбирующую бумагу, чтобы удалить остатки жидкости.

Примечание:

Чувствительность и точность данного анализа в значительной мере зависит от правильности исполнения процедуры промывки!

5. Раскапать **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки **кроме A1** и накрыть их пленкой.

6. Накрывать лунки пленкой. 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 абсорбирующую бумагу, чтобы удалить остатки жидкости.

Примечание:

Чувствительность и точность данного анализа в значительной мере зависит от правильности исполнения процедуры промывки!

8. Раскапать **100 мкл** раствора субстрата **во все** лунки

9. Накрывать и 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. Считать оптическую плотность при **450/620 нм** с помощью микротитрационного планшетного ридера в течении **30 минут** после внесения стоп-раствора.

6.3 Измерение

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

Если по техническим причинам ELISA считыватель не может быть настроен на ноль используя бланк субстрат 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 A1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.100**.
- **Отриц. контроль в B1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.200**.
- **Cut-off. контроль (CO) в C1/D1:** ⇒ значение абсорбции между **0.250-0.850**.
- **Положит. контроль в E1:** ⇒ значение абсорбции более **0.600**.

7.2 Вычисление

Среднее значение абсорбции "Cut-off" контроля [CO]

Рассчитать среднее значение абсорбции 2 определений cut-off контролей контролей (напр., в C1/D1).

Пример: $(0.44 + 0.46) \div 2 = 0.45 = CO$

7.3 Интерпретация

Средние значения абсорбции образцов пациента более чем на 10 % больше CO
(Средняя ОП_{пациент} > 1.1 x CO)
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ

(Средние) значения абсорбции пациентов от 10 % выше до 10 % ниже CO
повторить анализ 2 - 4 недели спустя на новых образцах пациентов
СЕРАЯ ЗОНА

результат второго анализа опять в «серой зоне»
ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ

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

7.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

среднее значение абсорбции пациента x 10
————— = [ЕДИНИЦЫ DRG = DU]
CO

1.580 x 10

Пример: ————— = 35 DU
0.45

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 анализа.

Пересматривается.

9.2 Диагностическая чувствительность

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

Пересматривается.

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Бактериологическое заражение или повторные циклы замораживания/размораживания образцов может повлиять на

значения абсорбции. Только в иммунокомпромированных пациентов и новорожденных серологические данные имеют ограниченные значения.

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, сывороточные 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.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com