



Набор реагентов для иммуноферментного анализа на Вирус простого герпеса 1 и 2 типа (ВПГ-1,2) IgM

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

Методика от 01-2008

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

1. ВВЕДЕНИЕ

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

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор NOVUM ВПГ-1,2 IgM ELISA - это набор для детекции антител класса IgM к ВПГ-1,2 в сыворотке 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 к ВПГ-1,2 антитела 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 - ридере.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для диагностики «ин-витро».
- Не использовать вместе реагенты или стрипы из разных лотов.
- Не использовать вместе реагенты разных производителей.
- Не использовать реагенты после окончания срока годности, указанного на этикетке.
- Использовать только чистые наконечники для пипеток, пипетки и лабораторный инвентарь.
- Не путать колпачки реагентов во избежание кросс-контаминации.
- Плотно закрывать флаконы с реагентами сразу после использования.
- После первого открывания и последующего хранения проверять флаконы конъюгата и контролей на микробную контаминацию перед дальнейшим использованием.
- Во избежание кросс-контаминации и ложно завышенных результатов пипетировать образцы пациентов и распылять конъюгат без распыливания прямо на дно лунок.
- Во время инкубации накрывать микротитровальные стрипы пленкой для предотвращения испарения.

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 разведения образцов IgM ***, 1 флакон.
Готов к использ., зеленого цвета, pH 7.2 ± 0.2.
3. 6,5 мл IgG-RF-сорбент***. 1 флакон. Готовый к использованию; желтого цвета.

4. 2 мл ВПГ-1,2 IgM положительный контроль***, 1 флакон. Готов к использ., желтого цвета, красный колпачок.

5. 2 мл ВПГ-1,2 IgM отрицательный контроль ***, 1 флакон. Готов к использованию, желтого цвета, желтый колпачок.

6. 2 мл Cut-off контроль***, 1 флакон. Готов к использованию, желтого цвета, черная крышка.

7. 20 мл Ферментный конъюгат**, 1 флакон. Готов к использованию, красного цвета; антитела к человеческому IgM конъюгированные пероксидазой хрена.

8. 14 мл Раствор ТМБ, 1 флакон. Готов к использованию, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.

9. 14 мл Стоп-раствор, 1 флакон. Готов к использованию, содержит 0.5 моль/л серной к-ты.

Предупреждение:

Серная к-та раздражает глаза и кожу. Хранить в недоступном для детей месте. при контакте с глазами промыть водой и проконсультироваться с врачом!

10. 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-нйтро-1.3-диоксан (BND) + 0.010 % 2-метил-2Н-изотиазол-3-один (MIT).

4.1.1 Необходимые но не поставляемые материалы

1. Микротитровальный планшетный калибровочный ридер (450/620нм +/- 10нм).
2. Калибровочные микропипетки разного объема.
3. Инкубатор на 37°C.
4. Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
5. Воротковый трубчатый миксер.
6. Таймер.
7. Абсорбирующая бумага.

4.2 Хранение и стабильность набора

Реагенты стабильны до даты срока годности, указанной на этикетке при хранении при 2 - 8 °С.

Не использовать реагенты после окончания срока годности!

4.3 Подготовка реагентов

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

Промывочный раствор

Развести 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.

стабильность после разведения: 4 недели при 2 ± 8 °С

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°C. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°C. Оттаявшие образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

5.3 Разведение образцов

Перед анализом разбавить сначала каждый образец пациента разбавителем образца. Для абсорбции ревматоидного фактора эти предварительно разбавленные образцы затем необходимо инкубировать вместе с IgG-RF-сорбентом.

1. Разведите каждый образец пациента **1+50** раствором для разведения образцов, напр., 10 мкл образца + 0,5 мл раствора для разведения (**хорошо смешать**).
2. Разведите этот предварительно разбавленный образец **1+1** с IgG-RF-сорбентом, напр., 60 мкл образца + 60 мкл IgG-RF-сорбента (**хорошо смешать**).
3. **Оставьте по крайней мере на 15 минут и снова хорошо перемешайте.**
4. Возьмите 100 мкл этих предварительно обработанных образцов для ИФА.

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

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

Внимательно прочитайте инструкцию перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от четкого следования инструкциям.

- **Перед использованием все реагенты довести до комнатной температуры.** Реагенты необходимо смешать без образования пены.

- Рекомендуется проводить процедуру непрерывно.

- Избегать контаминации реагентов, пипеток, и лунок/пробирок. Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для каждого реагента или образца.

- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, извлечь крышки, установить лунки в держатель и т.д. Это обеспечит непрерывное проведение каждого шага пипетирования.

- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Перед проведением анализа необходимо составить схему распределения и идентификации образцов и контролей с помощью формы вложенной в набор.

1. Отобрать требуемое количество микротитровальных стрипов 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 **готового к употр.** отрицательного контроля в лунки B1,
- 100 мкл **готового к употр.** "cut-off" контроля в лунки C1+D1,
- 100 мкл **готового к употр.** положительного контроля в лунку E1 и
- 100 мкл **каждого разведенного** образца пациента с **новыми одноразовыми наконечниками** в оставшиеся лунки согласно схеме. Оставить лунку A1 для бланка субстрата!

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

4. Резко вытряхните содержимое лунок. Промойте их **5 раз 300 мкл/лунку** рабочего промывочного раствора. В конце осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!

Примечание:

Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.

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

6. Накрыть лунки пленкой. Инкубировать: **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °С).** Не подвергать воздействию прямого солнечного света!

7. Повторить процедуру промывки как описано в этапе 4.

Примечание: *осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку!*

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

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

6.3 Измерение

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

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на нуль используя бланк субстрат в лунке A1, 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 схему.

Двойная длина волны – рекомендуется считывать на 620 нм как референтной длине волны. Где применимо рассчитать среднее значение 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 **0.350-0.700**.
- **Положит. контроль in E1:** ⇒ значение абсорбции более **0.700**.

7.2 Вычисление

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

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

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

7.3 Интерпретация

Средние значения абсорбции образцов пациента
более чем на **10 % больше CO**
⇒ **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

(Средние) значения абсорбции пациентов
от **10 % выше до 10 % ниже CO**
⇒ **серая зона** ⇒ повторить анализ
2 - 4 недели спустя – на новых пробах пациентов

результат второго анализа опять
в «серой зоне»
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

средние значения абсорбции пациента
более чем на **10 % ниже CO**
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

7.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

среднее значение абсорбции пациента x 10
_____ = [DRG UNITS = DU]
CO

1.580 x 10

Пример: _____ = **26 DU**

0.60

Интерпретация результатов

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

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