



Набор ИФА для количественного определения антител в сыворотке к дифтерии

Каталог. № : 8118-3
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 20-06-2008

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

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Для количественного определения ответной реакции антител в сыворотке к анатоксину дифтерии.

ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Микролуночки для анализа покрыты антигеном анатоксина дифтерии. В течение первой инкубации с разбавленными сыворотками пациентов, любые антитела, взаимодействующие с антигеном, связываются с покрытыми лунками. После промывки для удаления остатка образца добавляется ферментный конъюгат. Если антитела закрепились на лунках, затем ферментный конъюгат свяжется с этими антителами. После других серий промывок добавляется хромоген (тетраметилбензидин/ТМВ). При наличии ферментного конъюгата, пероксидаза катализирует реакцию, которая потребляет пероксид и превращает хромоген из прозрачного в синий. Добавление стоп раствора останавливает реакцию и превращает синий цвет в ярко-желтый. После этого реакцию можно считать визуально или с помощью иммуноферментного считывателя (ELISA).

РЕАГЕНТЫ

Позиция	Описание
Полоски для анализа	Микролуночки, содержащие антигены анатоксина дифтерии - 96 лунок в рамке для полосок.
Ферментный конъюгат	1 бутылка с 11 мл белка А, конъюгированного с пероксидазой.
Стандарты	4 флакона с 2 мл разбавленной положительной сыворотки человека.
Хромоген	1 бутылка с 11 мл хромогена тетраметилбензидина (ТМВ).
Промывочный концентрат (20х)	1 бутылка с 25 мл концентрированного буфера и поверхностно-активного вещества.
Буфер для разбавления	2 бутылки с 30 мл раствора буферизованного раствора белка.
Стоп раствор	1 бутылка с 11 мл 1М фосфорной кислоты.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не используйте растворы, если они выпадают в осадок или становятся мутными. Промывочный концентрат может кристаллизироваться во время хранения при 2-8°C. Кристаллизация исчезает после разбавления до рабочего состояния.

Не используйте сыворотку, которая, возможно, использовалась для поддержки роста микроорганизмов, или мутную сыворотку исходя из насыщенного содержания липидов. Образцы с высоким содержанием липидов должны быть перед использованием очищены.

Обращайтесь со всеми сыворотками как будто с инфекционными.

Отрицательный контроль был проверен необходимыми методами и оказался отрицательным к поверхностному антигену гепатита В и к ВИЧ антителам. Так как никакое испытание не может предоставить полной гарантии, что возбудителей инфекций нет, это изделие должно использоваться в соответствующих безопасных условиях, которые бы использовались при любых потенциальных возбудителях инфекций.

Не добавлять в образцы или в любые реагенты азиды.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагенты, полоски и компоненты в бутылках: Хранить при 2-8°C. Гибкая бутылка с разбавленным промывочным буфером может храниться при комнатной температуре.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Промывочный буфер – снимите колпачок и добавьте содержимое бутылки к 475 мл дистиллированной воды. Перенесите разбавленный промывочный буфер в гибкую бутылку.

Замечание: промывки состоят из заполнения до края каждой лунки, встряхивания содержимого и обратного заполнения.

Избегать образования пузырьков в лунках в течение этапов промывки.

СБОР И ПОДГОТОВКА СЫВОРОТКИ

- Коагулируйте кровь и удалите сыворотку. Заморозьте образец до -20°C или ниже если он не используется сразу.
- Не инактивируйте сыворотку теплом и избегайте повторного замораживания и размораживания образцов.
- Анализируемые образцы: Проведите разбавление сывороток пациентов 1:100 и 1:1000 с помощью буфера для разбавления.

ПРОЦЕДУРА

Поставляемые материалы

Микролуночный серологический ELISA набор для определения анатоксина дифтерии.

Требуемые, но не поставляемые материалы

- Пипетки.
- Гибкая бутылка для промывки полосок (рекомендуется узкий наконечник).
- Подготовленная для реагентов вода (дистиллированная) и мерная колба.
- Пробирки для разбавления образца.
- Промокательная бумага
- Планшеточный считыватель ELISA для считывания планшетов с фильтром 450/620-650 нм (выборочно, результаты могут считываться визуально).

ПРОЦЕДУРА

1. Отломить требуемое количество лунок (две для контролей и определенного количества образцов) и положить в рамку для полосок.

2. Добавить по 100 мкл каждого калибратора в лунку #1-4, затем добавить по 100 мкл разбавленных образцов для анализа в остальные лунки.

Замечание: Стандарты поставляются предварительно разбавленными. Не разбавлять.

3. Инкубировать при комнатной температуре (15 - 25°C) в течении 10 минут.

4. Вытряхнуть содержимое и промыть 3 раза разбавленным промывочным буфером .

5. Добавить в каждую лунку по 2 капли ферментного конъюгата.

6. Инкубировать при комнатной температуре в течении 5 минут.

7. Вытряхнуть содержимое и промыть 3 раза промывочным буфером. Затем промыть 1 раз дистиллированной водой. Ударить лунками по бумажным полотенцам, чтобы удалить остаток влаги.

8. Добавить в каждую лунку по 2 капли хромогена. Перемешать, осторожно постукивая по рамке для полосок.

9. Инкубировать при комнатной температуре в течении 5 минут.

10. Добавить по 2 капли стоп раствора и перемешать, постукивая по рамке для полосок.

СЧИТЫВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Считыватель ELISA: В рабочем состоянии установить считыватель на нуль. Настроить на бихроматические считывания на 450/650-620 нм.

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Этот анализ определяет относительное количество DAT антител в сыворотке. Это не может использоваться для диагностики активной болезни или окончательно определения иммунного/неиммунного состояния.

ОБНАРУЖЕНИЕ И РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Отрицательный контроль значительно развил цвет.

Проблема: Несоответствующие промывки.

Исправление: Удалите остаток жидкости из лунок постукивая ими на промокательном полотенце. Не позволяйте анализируемым лункам высохнуть.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Создайте калибровочную кривую, используя результаты меры поглощения света (абсорбции - ОП) четырех контролей и Международных единиц контролей (МЕ), включенных в наборе. Все графики должны быть на линейно-логарифмической бумаге 10: ось Y для меры поглощения света и ось X для МЕц. Постройте координаты контроля и выведите наилучшую подобранную линию. Используя

данные меры поглощения света и калибровочной кривой как руководство, определите приблизительную МЕ для каждого образца. Как только значение МЕ было определено с помощью графика, умножьте это число на коэффициент разбавления образца.

Пример:

Образец "А" имеет меру поглощения света 0.4 единицы ОП при разбавлении сыворотки 1:100. Это значение ОП соответствует значению МЕ 0.008 МЕ/мл. Таким образом, образец имеет значение DAT 0.8 МЕ/мл (0.008 x 100 разбавления).

Литература:

(См. в оригинале инструкции).

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
а/я 742
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775 612
E-mail: info@diameb.com