



Крышка для накрывания микротитрационных стрипов во время инкубации.

#### СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Все компоненты набора, кроме 20х концентрированного промывочного буфера, должны храниться при 2-8°C и использоваться до даты истечения срока годности, указанного на этикетке. Хранить 20х концентрированный промывочный буфер при комнатной температуре.
- В случае образования кристаллов в буфере, просто следует нагревать реактивную бутылку до 37°C, пока кристаллы полностью не растворятся.
- Неиспользованные стрипы должны быть помещены в мешочек, содержащий осушитель и плотно закрыты перед хранением при 2-8°C. После вскрытия стрипы стабильны пока осушитель не станет розовым.
- Разбавленный промывочный раствор может храниться в течение 1 недели при комнатной температуре или 1 месяц при 2-8°C.
- Готовый с использованием фермент, конъюгированный анти-человеческими антителами, сразу после вскрытия стабилен до окончания срока годности на этикетке. Предотвращать от загрязнения. Не возвращать неиспользованную часть конъюгированного ферментом раствор анти-человеческого IgM обратно в бутылку с исходным раствором.
- Все другие жидкие реагенты стабильны если хранить при 2-8°C, при условии, что с ними обращаются внимательно во избежание любого загрязнения окружающей среды. Прежде, чем их выбросить или обработать в автоклаве, они должны рассматриваться как потенциально инфекционные.

## Набор ИФА

### для полуколичественного и качественного определения в сыворотке и плазме антител класса IgM к краснухе

Каталог. № : DRUB3045M

Количество : 96

Производитель: Orngenium Laboratories (Финляндия)

Методика 2.9

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

#### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор компании «Орджениум Лабораториз» Rubella IgM Antibody EIA Test разработан для **полуколичественного и качественного** определения специфических антител класса IgM в сыворотке и плазме к краснухе.

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

Окончательный диагноз должен быть поставлен квалифицированным врачом в контексте клинической истории пациента в сочетании с другими подтверждающими диагностическими методами при их применении.

#### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящее исследование основано на принципе иммуноферментных анализов (ИФА). Очищенный антиген наносится на поверхность лунок микротитрационного планшета. Разбавленные образцы и контроли капают из пипетки в лунки микротитрационного планшета. Происходит закрепление между антителами класса IgM в сыворотке (или плазме) и иммобилизованным антигеном. После 30-минутной инкубации при 37°C планшет промывается разбавленным промывочным раствором, чтобы удалить несвязанный материал. Впоследствии, конъюгат пероксидазы анти-человеческого IgM добавляется и инкубируется в течение 30 минут при 37°C. После дальнейшей промывки раствора (ТМВ) субстрата капается из пипетки и инкубируется в течение 15 минут при 37°C, стимулируя развитие синего цвета в лунках. Развитие цвета прекращается добавлением стоп-раствора, который изменяет цвет от синего до желтого. Получившийся окрас измеряется спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Общее время инкубации: **75 минут**.

#### КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

1. **Микролуночный планшет**, 1 шт. : 12x8 лунок  
Микротитрационные стрипы, помеченные определенным цветом и кодом, каждая состоящая из 8 лунок, покрытых очищенным антигеном краснухи. Цветовые и текстовые коды указывают исследуемый на стрипе патоген.
2. **Отрицательный контроль**, 1 флакон  
Готовый к использованию.
3. **Положительный контроль**, 1 флакон  
Готовый к использованию.
4. **Ферментный конъюгат\*\***, 15 мл  
Антитела к человеческому IgM, конъюгированные с пероксидазой хрена, синего цвета. Готовый к использованию.
5. **Раствор субстрата ТМВ**, 8 мл  
Содержит раствор 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Готовый к использованию; потенциально опасен при контакте с кожей; раздражает глаза.
6. **Стоп-раствор ТМВ**, 8 мл  
Содержит раствор 2 N серной кислоты (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
Готовый к использованию; избегать контакта со стоп-раствором; он может вызвать раздражения кожи и ожоги.
7. **Разбавитель образцов\*\*\***, 120 мл  
Готовый к использованию. Зеленого цвета.
8. **Промывочный буфер – концентрат**, 50 мл 20х концентрированный  
После разбавления проверить pH разбавленного промывочного буфера и при необходимости довести его pH до 7,4.
9. **Крышка планшета**, 1 шт.

#### ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Должны использоваться образцы сыворотки или плазмы (ЭДТА, гепарин); соблюдать обычные предосторожности при венепункции. Образец может храниться при 2-8°C до 48 часов, но должен быть заморожен до -20°C или ниже в течение более длительного хранения.
- Необходимо избегать повторного замораживания/размораживания.
- Размороженные образцы должны быть перевернуты несколько раз перед исследованием.
- Не использовать чрезвычайно гемолизированные или липемические образцы.

#### ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ МАТЕРИАЛЫ:

- Таймер
- Вихревой смеситель (вортекс)
- Пробирки для разбавления образцов на 2 или 4 мл
- Дозаторы (3, 20, 50, 100, 500 мкл и 1 мл) и многоканальный дозатор (400 мкл)
- Одноразовые наконечники
- Инкубатор, способный к поддержанию 37±2°C
- Дистиллированная вода
- Мерные колбы для подготовки промывочного раствора
- Магнитная мешалка и дополнительная стойка для подготовки промывочного буфера
- Резервуары реагентов для многоканальных дозаторов
- Бумажные полотенца или промокательная бумага
- Микротитрационный ИФА-ридер, способный измерять абсорбцию при 450 нм.
- Микротитрационный планшет-вошер (выборочно).

#### ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

Всем реагентам, образцам и контролям нужно позволить достичь комнатной температуры перед использованием.

##### 1. Образцы сыворотки и плазмы

**Перемешать вихревым смесителем и разбавить** образцы сыворотки 1:101 готовым к использованию разбавителем сыворотки (например, 5 мкл образца + 500 мкл разбавителя образца).

**5 мкл образца + 500 мкл разбавителя образца**

##### 2. Промывочный буфер

**Хорошо перемешать и разбавить** концентрат промывочного буфера дистиллированной водой 1:20 (например, 50 мл концентрата + 950 мл дистиллированной воды). Если во время хранения в холодном месте образуется осадок кристаллов, концентрат нужно нагревать до 37°C в течение 15 минут. Проверить pH разбавленного промывочного буфера и если необходимо сбалансировать его pH на

уровне 7.4. Промывочный буфер стабилен 1 месяц при 2-8°C или в течение 1 недели при комнатной температуре.

**50 мл концентрата промывочного буфера + 950 мл дист. воды**

#### ВАЖНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- По крайней мере за 1 час до использования привести все реагенты, набор калибраторов и образцы к комнатной температуре (18-30°C), тщательно их перемешивая вихревым смесителем.
- Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно государственным нормам. Рекомендуется использование контрольных сывороток или плазмы, чтобы обеспечить проверку правильности относительно результатов. Использовать контроли и на нормальных и патологических уровнях.
- Периоды распределения и инкубации должны быть одинаковыми для всех лунок в том же анализе. При ручном проведении анализа использовать многоканальный дозатор.
- Как только анализ начат, все этапы должны быть завершены без прерывания. Используйте новые одноразовые пластмассовые наконечники дозатора для каждого реагента.
- Не позволять реакционным лункам высыхать в течение процедуры анализа. Это может вызвать высокие фоновые помехи в лунках бланка и ошибочные результаты.
- Если Вы не готовы к следующему этапу, или если процедура анализа неожиданно прервана, просто оставьте лунки в промывочном буфере. Однако, не более чем на 5 минут.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Подготовить образцы и разбавленный промывочный буфер** как описано выше.

2. **Определить требуемое количество** 8-луночных стрипов. Настоятельно рекомендуется анализировать каждый образец и контроль в дубле.

**Рекомендуемое размещение контролей:**

- 2 лунки (например, А1 и В1): для бланка субстрата (100 мкл разбавителя образца)

- 2 лунки (например, А2 и В2): для отрицательного контроля (100 мкл)

- 2 лунки (например, А3 и В3): для положительного контроля (100 мкл)

Остальные лунки используются для образцов пациентов.

3. Закрепить в штативе желаемое количество микротитрационных стрипов и накрыть пленкой для планшета (поставляемой). Возвратить остальные стрипы в мешочек и хранить при 2-8°C.

4. **Раскапать по 100 мкл разбавителя образца, контролей и разбавленных образцов** в соответствующие лунки стрипов.

5. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **30 минут при 37°C**.

6. **Промывка:** Процедура промывки крайне важна и должна проводиться с осторожностью. Неправильная промывка может вызвать неточные результаты, такие как низкая точность и высокий фон. Промывать планшеты вручную или используя автоматический планшет-вошер.

При ручной промывке энергично вытряхнуть жидкость, и добавить 300 мкл разбавленного промывочного буфера. Освободить лунки, вытряхнув жидкость, чтобы удалить любые ее остатки. Повторить эту процедуру, чтобы в общем количестве составило 4 промывки. По завершении последней промывки перевернуть планшет и постучать о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки и прерывания.

При автоматической промывке произвести аспирацию всех лунок и промыть 4 раза **300 мкл разбавленного промывочного буфера**. Опорожнить лунки, вытряхнув жидкость, для удаления ее остатков. Повторить эту процедуру, что в общем количестве получилось **4 промывки**. После конечной промывки перевернуть планшет и постучать ним о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки или прерывания.

При автоматической промывке произведите аспирацию всех лунок и промойте 4 раза **300 мкл разбавленного промывочного буфера**. Постучать планшетом о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки и прерывания.

7. Добавить последовательно по **100 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку.

8. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **30 минут при 37°C**.

9. **Промывка:** Промыть планшет следуя процедуре в этапе 6.

10. **Быстро раскапать по 50 мкл** раствора ТМБ в промытые лунки.

11. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **15 минут при 37°C**.

12. Остановить реакцию, добавив 25 мкл стоп-раствора ТМБ в каждую лунку. Осторожно встряхнуть и считать при 450 нм в пределах **20 минут** с момента добавления стоп-раствора.

#### СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

Разбавленный образец 50 мкл	Ферментный конъюгат 50 мкл	Субстрат ТМБ 50 мкл	Стоп-раствор ТМБ 25 мкл
30 мин. Инкубации при 37°C.	30 мин.	15 мин.	Считать планшет

#### ЗНАЧЕНИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Перед началом расчета результатов убедитесь, что полученные значения для реагента бланка и контролей находятся в пределах предоставленных в Таблице 1 значений.

Таблица 1: Значения контроля качества

Образец	Ожидаемый результат
Контрольный реагент	Значение абсорбции < 0.150
Отрицательный контроль	Значение абсорбции < 0,200 *(Отриц. с соотнош. s/co < 0,8
Положительный контроль	Положительный (соотнош. s/co ≥ 1)

\*s/co – абсорбция образца/пороговое значение

Результаты считаются достоверными только если значение абсорбции бланка не превышает 0,150 и значение средней абсорбции отрицательного контроля не превышает 0,200.

#### РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

##### 1. Расчет ОП порогового значения (cut-off):

**ОП Cut-off = константа Cut-off x (ОП полож. константы – ОП отриц. константы) \***

Показатель константы порогового значения см. в Сертификате контроля качества, сопровождающий этот набор. Для точной интерпретации результатов обязательно использовать правильный показатель константы порогового значения.

##### 2. Расчет соотношения s/co:

**S/CO = значение ОП образца\* - ОП отрицательного контроля / ОП порогового значения**

\*Настоятельно рекомендуется анализировать каждый контроль в дубле. Просьба использовать средние значения абсорбции каждого контроля/образца исходя их формул выше.

##### 3. Схема интерпретации результатов соотношения s/co:

Соотношение s/co	Интерпретация
<0,80	Отрицательный
0,80-0,99	Сомнительный
>1	Положительный

##### 4. Диагностическая достоверность результатов

Таблица 2: Диагностическая достоверность и интерпретация результатов.

	Результаты IgG	Результаты IgM	Интерпретация
Краснуха	Положительный или отрицательный	Положительный	Острая инфекция
	Положительный	Отрицательный	Прошедшая инфекция
	Отрицательный	Отрицательный	Антител не обнаружено

##### 5. Полуколичественный расчет результатов анализа

Вы можете перевести значение ОП Вашего образца в ИФАЕ (иммуноферментные единицы) следующим образом:

**ИФАЕ = S/CO x 25**

##### 6. Интерпретация образцов острой фазы болезни и в состоянии выздоровления

Для определения сероконверсии необходимо сравнить значения ОП парных образцов и рассчитать следующее:

**% изменения = (значение ОП 2го образца – значение ОП 1го образца) / Значение ОП 1го образца x 100**

