

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ПАРВОВІРУС B19 IgM ELISA

Parvovirus B19 IgM ELISA

Каталог. №: **EIA-3504**

Дата випуску інструкції: **2012/05**
Версія **11.0**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1. ВСТУП

Імуноферментна тест-система для якісного та напівкількісного визначення IgM антитіл до Парвовірусу B19 в людській сироватці. Тільки для використання в діагностиці in vitro.

2. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Даний аналіз є твердофазним імуноферментним аналізом (ELISA). Зразки пацієнтів розбавляють з *Розчинником для Зразків* і додатково інкубують з *IgG-RF-сорбентом*, що містить гіперімумні антилюдські антитіла IgG-класу для усунення конкурентного інгібування від конкретного IgG і видалення ревматоїдних факторів. Ця попередня обробка дозволяє уникнути помилкових результатів. Мікротитрові лунки в якості твердої фази покриті антигеном Парвовірусу B19.

Підготовлені зразки пацієнта і **готові до використання контролю** піпетують в ці лунки. Під час інкубації специфічні до Парвовірусу B19 антитіла позитивних зразків та контролів зв'язуються з іммобілізованими антигенами.

Після промивання для видалення незв'язаного зразка і контрольного матеріалу, пероксидаза хрому, кон'югована з антилюдськими IgM-антитілами, вноситься в лунки. Під час другої інкубації цей анти-IgM кон'югат зв'язується специфічно з IgM-антитілами, що приводить до формування ферментно-зв'язаного імунного комплексу.

Після другого промивання для видалення незв'язаного кон'югату сформовані імунні комплекси (у разі позитивного результату) виявляються за допомогою інкубації з ТМВ субстратом та розвитку блакитного кольору. Блакитний колір перетворюється на жовтий зупиненням ферментної реакції сірчаною кислотою.

Інтенсивність цього кольору прямо пропорційна кількості специфічних до Парвовірусу B19 IgM антитіл.

Абсорбція при 450 нм зчитується з використанням мікропланшетного рідера.

3. ПЕРЕСТОРОГИ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Тільки для діагностичного використання "in-vitro". Для використання тільки кваліфікованим персоналом.
- Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
- Перед початком аналізу повністю та уважно прочитати інструкцію. Використовувати дійсну версію інструкції. Впевніться, що все зрозуміло.
- Мікропланшет складається з відривних смужок. Невикористані лунки зберігати при 2-8 °С запакованими, та використовувати рамку, яка постачається.
- Піпетування взірців та реагентів проводити як можна швидше та з однаковими інтервалами для кожного кроку.
- Використовувати пробірки тільки для одного реагенту. Це особливо відноситься до пробірок з субстратами. Використання резервуару для дозування розчину субстрату, який раніше був використаний для кон'югатного розчину, може призвести до забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакон, оскільки забруднення може статися.
- Змішуйте вміст лунок мікропланшетів повністю, щоб забезпечити хороші результати тесту. Не використовуйте повторно лунки.
- Не дозволяйте лункам висихати під час аналізу; додавати реагенти негайно після закінчення полоскання.
- Дозволіте реагентам досягти кімнатної температури (21-26 °С) до початку тесту. Температура може вплинути на значення оптичної щільності.

- Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкiрою і слизовими.
- Не їжте, не пийте і не куріть в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
- Одягайте рукавички при роботі із зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.
- Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
- Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
- Не змішуйте реагенти різних серій і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
- Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Паспорт Безпеки Матеріалів.
- Хімічні речовини і приготовлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
- Паспорт Безпеки Матеріалів доступний за запитом.

4. КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

4.1 Склад набору

- Мікротитрові лунки**, 12x8 (роздільні) смужки, 96 лунок; лунки покриті антигеном Парвовірусу B19 (вкл. 1 тримач для смужок і 1 плівку для накривання).
- Розчин для розведення зразків***, 1 флакон, 100 мл, готовий до використання, жовтого кольору.
- IgG-RF-сорбент***, 1 флакон. 6.5 мл, готовий до використання, жовтого кольору. Містить анти-людські антитіла класу IgG.
- Позитивний контроль***, 1 флакон, 2.0 мл, готовий до використання, жовтого кольору, червоний ковпачок.
- Негативний контроль***, 1 флакон, 2.0 мл, готовий до використання, жовтого кольору, жовтий ковпачок.
- Cut-off контроль***, 1 флакон, 2.0 мл, готовий до використання, жовтого кольору, чорний ковпачок.
- Ферментний кон'югат***, 1 флакон, 20 мл, готовий до використання, червоного кольору, антитіла до людського IgM, кон'юговані з пероксидазою хрому.
- Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, ТМВ.
- Стоп Розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, містить 0.2 моль/л H₂SO₄.
Уникайте контакту зі стоп розчином. Може викликати роздратування шкіри і опіки.
- Промивний розчин***, 1 флакон, 30 мл (концентрація 20x для 600 мл); рН 6.5±0.1. Див. "Підготовка реагентів".

*Містить не ртутний консервант.

4.1.1 Необхідні матеріали та обладнання, які не постачаються

- Мікротитровий планшетний відкалібрований рідер (450/620 нм ± 10 нм).
- Відкалібровані мікропіпетки змінного об'єму.
- Інкубатор.
- Ручне або автоматичне обладнання для промивки лунок.
- Вортексний міксер.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Таймер.
- Промокальний папір.

4.2 Умови зберігання

При зберіганні при температурі 2-8 °С активність реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати.

Відкриті реагенти та лунки повинні зберігатись при 2-8 °С.

Після відкриття мішечка із фольги треба знову його герметично закрити. Відкритий набір стабільний два місяці при зберіганні, як вказано вище.

4.3 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість стрипів до кімнатної температури.

Промивний розчин

Розвести **Промивний Розчин 1+19** (наприклад, 10 мл + 190 мл) свіжою, без бактерій редистильованою водою. Цей розбавлений **Промивний Розчин** має значення рН 7.2 ± 0.2.

Витрата: ~ 5 мл на визначення.

Кристали в розчині зникають при нагріванні до 37 °С на водяній бані. Впевніться, що кристали повністю розчинилися перед використанням. **Розведений Промивний Розчин** стабільний протягом 4 тижнів при 2-8 °С.

4.4 Утилізація набору

Утилізацію набору слід проводити відповідно до вимог техніки безпеки. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки.

4.5 Пошкодження набору

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Окремі пошкоджені компоненти не слід використовувати.

5. ЗРАЗКИ

Для аналізу потрібно використовувати сироватку. НЕ використовувати гемолізовані, іктеричні або ліпемічні зразки.

5.1 Збір зразків

Сироватка:

Зберіть кров венепункцією (наприклад, Зарштедт Monovette # 02.1388.001), дайте їй згуститися і відокремте сироватку центрифугуванням при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного згортання крові. Пацієнти, які проходять антикоагуляційну терапію, можуть вимагати додаткового часу для згущення крові.

5.2 Зберігання зразків

Зразки потрібно зберігати закритими до 24 годин при 2-8 °C перед проведенням аналізу. Для більш тривалого періоду зберігання їх потрібно заморозити при - 20 °C. Розморожені зразки потрібно кілька разів перевернути перед проведенням аналізу.

5.3 Розведення зразків

Перед аналізом кожен зразок пацієнта спочатку слід розбавити *Розчином для Розбавлення Зразків*. Для абсорбції ревматоїдного фактору ці попередньо розбавлені зразки потім повинні інкубуватися разом з *IgG-RF-сорбентом*.

1. Розбавити кожен зразок пацієнта **1+50 Розчином для Розбавлення Зразків**; напр., 10 мкл зразка + 0.5 мл *Розчину для Розведення. Добре змішати.*
2. Розбавити цей попередньо розбавлений зразок **1+1 IgG-RF-Сорбентом** напр., 60 мкл попередньо розведеного зразка + 60 мкл *IgG-RF-Сорбенту. Добре змішати.*
3. **Залишити принаймні на 15 хвилин при КТ і добре перемішати знову або на ніч при 2-8 °C і знову добре перемішати.**
4. Взяти 100 мкл цих попередньо оброблених зразків для ІФА.

Увага: Контролі готові до використання і їх не треба розводити!

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- **Доведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком дослідження.**
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакові інтервали часу.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.
- Закривати пробірки з реагентом щільно відразу після використання, щоб уникнути випаровування і мікробного забруднення.
- Щоб уникнути перехресного забруднення і хибно завищених результатів піпетувати зразки та розподіляти кон'югат без бризок точно на дно лунки.
- Під час інкубації покрити мікротитрові смужки фольгою щоб уникнути випаровування.

6.2 Процедура дослідження

Перед початком проведення аналізу необхідно розбавити *Розчин для Промивання*, **приготуйте зразки пацієнтів як описано в п. 5.3** та уважно складіть для всіх зразків і контролів **план розподілу та ідентифікації**, вкладений в набір.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитрових лунок у штативі рамки.

Додайте принаймні:

- | | | |
|---------|-------------|-----------------------------------|
| 1 лунку | (напр., А1) | для бланка субстрату, |
| 1 лунку | (напр., В1) | для <i>негативного контролю</i> , |

- | | | |
|---------|------------------|-----------------------------------|
| 2 лунки | (напр., С1 + D1) | для <i>Cut-off Контролю</i> та |
| 1 лунку | (напр., Е1) | для <i>Позитивного Контролю</i> . |

2. На розсуд користувача можна ставити зразки і контролі в дублях.
Розкапати:
100 мкл Негативного Контролю в лунку В1
100 мкл Cut-off контролю в лунки С1 і D1
100 мкл Позитивного Контролю в лунку Е1 і
100 мкл кожного попередньо обробленого зразка новими одноразовими наконечниками у відповідні лунки. Залишити лунку А1 для бланка субстрату!
3. Накрити лунки плівкою, що поставляється в наборі. Інкубувати **60 хвилин при 37 °C**.
4. Різко витрусити вміст лунок.
Промити їх 5 раз розбавленим *Розчином для Промивання (300 мкл/лунку)*. Різко витрусити лунки на промокальний папір, щоб видалити залишки рідини.
Примітка:
Чутливість і точність даного аналізу в значній мірі залежать від правильності виконання процедури промивання!
5. Додати **100 мкл Ферментного Кон'югату** в усі лунки **крім А1**.
6. Інкубувати **30 хвилин при кімнатній температурі (20-25 °C)**. *Не піддавати дії прямого сонячного світла!*
7. Різко витрусити вміст лунок.
Промити їх 5 раз розбавленим *Розчином для Промивання (300 мкл/лунку)*. Різко витрусити лунки на промокальний папір, щоб видалити залишки рідини.
8. Додати **100 мкл Розчину Субстрату** у всі лунки.
9. Інкубувати **рівно 15 хвилин при кімнатній температурі (20-25 °C) в темряві**.
10. Зупинити ферментну реакцію шляхом внесення **100 мкл Стоп Розчину** в кожну лунку. Будь-яке блакитне забарвлення, що проявилось під час інкубації, переходить в жовте.
Примітка: високо-позитивні зразки пацієнтів можуть мати темний осад хромогену!
11. Зчитати оптичну щільність при **450/620 нм** за допомогою мікропланшетного зчитувача **на протязі 30 хвилин** після внесення *Стоп Розчину*.

6.3 Вимірювання

Налаштувати мікропланшетний рідер **на нуль**, використовуючи **бланк субстрату в лунці А1**.

Якщо з технічних причин ELISA рідер не може бути налаштований на нуль використовуючи бланк субстрат в лунці А1, віднімайте значення абсорбції лунки А1 із всіх інших значень абсорбції.

Виміряти абсорбцію у всіх лунках при **450 нм** і записати значення абсорбції для кожного контролю та зразка пацієнта в схему.

Подвійна довжина хвилі - рекомендується зчитувати при 620 нм як референтній довжині хвилі.

Де можливо, розрахувати **середнє значення абсорбції** всіх дублів.

7. РЕЗУЛЬТАТИ

7.1 Надійність процесу аналізу

Постановка аналізу може вважатися дійсною за дотримання таких умов:

Бланк субстрату в А1: Значення абсорбції **менше 0.100**

Негативний контроль в В1: Значення абсорбції **менше 0.200**

Cut-off контроль (СО) в С1/D1: Значення абсорбції **між 0.350-0.850**

Позитивний контроль в Е1: Значення абсорбції **між 0.650-3.000**

7.2 Обчислення

Середнє значення абсорбції Cut-off контролю [СО]

Розрахувати середнє значення абсорбції 2 визначень негативних контролів (напр., в С1/D1).

Приклад: (0.44 + 0.45) ÷ 2 = 0.445 = СО

7.3 Інтерпретація

ПОЗИТИВНИЙ (Середні) значення абсорбції зразків пацієнта **більше ніж на 20% більше СО**

СИРА ЗОНА (Середні) значення абсорбції пацієнтів від 20% вище до 10% нижче СО

повторити аналіз 2-4 тижні потому - на нових зразках пацієнтів

Результат другого аналізу знову в «сірій зоні» ⇒ **НЕГАТИВНИЙ РЕЗУЛЬТАТ**

НЕГАТИВНИЙ середні значення абсорбції пацієнта **більше ніж на 10% нижче СО**

7.3.1 Результати в DRG одиницях [DU]

Середнє значення абсорбції пацієнта $\times 10/\text{CO} = [\text{Одиниці DRG} = \text{DU}]$

Приклад: $1.580 \times 10/0.445 = 35 \text{ DU}$

Інтерпретація результатів

Значення Cut-off: 10 DU
Сіра зона: 9 - 12 DU
Негативний: < 9 DU
Позитивний: > 12 DU

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контролю згідно державним і місцевими нормами. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролю і нормального рівня, і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовуватись національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають в установленні границі матеріалів контролю, результати являються не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Діагностична Специфічність

Діагностична специфічність визначається як можливість аналізу отримувати негативний результат в присутності специфічного аналіта.

Вона становить 100 %.

9.2 Діагностична Чутливість

Діагностична чутливість визначається як можливість аналізу отримувати негативний результат в присутності специфічного аналіта.

Вона становить 100 %.

10. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Бактеріальне забруднення або повторювані цикли заморожування-відтавання зразка можуть вплинути на значення абсорбції.

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

Дослідження необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів.

Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролю знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури.

11.2 Терапевтичні заключення

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного дослідження і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3 Відповідальність

Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах дослідження. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/170 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

