Набор ИФА для определения антител класса IgG в человеческой сыворотке или плазме к КРАСНУХЕ

Кат. № **: K2RG**
Количество **: 96; 192**
Производитель **: Radim (Италия)**

*Методика от **07-2008***
Версия 11

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

ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОЛЬКО В ДИАГНОСТИКЕ IN VITRO

1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Краснуха является тогавирусом РНК сферическорй формы, 60 нм в диаметре. Краснуха зачастую причиняет легкое недомогание, делая пациента полностью избавляя его от защиты иммунитета. Однако, при заражении во время беременности, болезнь может в значительной мере повлиять на плод, особенно в первый триместр беременности. Повреждения сердечно-сосудистой системы, глухота, хориоретинит, задержка умственного развития и роста – некоторые из повреждений плода, вызванные вирусом. Около 10-20% способных к зачатию женщин не поддававшихся вакцинации, достигнут зрелого возраста без приобретения иммунитета против вируса краснухи.

Диагностика краснухи проводится или путем определения увеличения антител класса IgG к краснухе путем исследования двух образцов крови, собранных в разное время, или также путем анализа на наличие антител класса IgM в единственном образце. Для этой цели анализ на антитела класса IgM к краснухе является наиболее общим методом для определения острой стадии инфекции краснухи.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Этот набор основан на методе иммуноферментного анализа (ИФА), где пероксидаза хрена используется как ферментный конъюгат. Во время первой инкубации, антитела IgG к краснухе в образце, если таковые имеются, связываются с антигеном краснухи, привитым к лункам. Цикл промывки устраняет весь несвязанный материал. В последующей инкубации второе антитело (античеловеческий IgG, конъюгированный пероксидазой), связывается с комплексом краснуха-антиген-антитело. После дальнейшего цикла промывки бесцветный раствор хромогена (тетраметилбензидина, TMB) в буфере субстрата добавляется в лунки где он, реагируя с ферментом пероксидазы образует цветное соединение. Развитие цвета будет остановлено при добавлении H2SO4. Интенсивность цвета, измеряемая на спектрофотометре при 450 нм и 405 нм, будет таким образом прямо пропорциональной концентрации антител класса IgG к краснухе в калибраторах и образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок (кат. K2RG), или для 192 лунок (кат. K2RGB).
- хранить набор при 2-8^{0}C.
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона.
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8^{0}C в течение 2 месяцев.

3.1 Специфические реагенты

- **Привитый микропланшет:** 1 планшет на 96 делимых лунок покрытых вирусным антигеном краснухи. Держите неиспользованные лунки при 2-8°C в поставляемом полиэтиленовом пакете тщательно закрытым.
- **Калибраторы:** анти- краснухи IgG в серологической основе, в следующих концентрациях: 15, 30, 60, 120 и 240 МЕ/мл. Готовый к использованию, красного цвета, за исключением 15 МЕ/мл калибратора, который синего цвета. Консервант: NaN3 (< 0.1 %).Калибраторы были калиброваны в соответствии с 2м стандартом I.S. ВОО3 67/182, 1986 г.
- **Ферментный конъюгат:** мышиный моноклональный анти-человеческий IgG, конъюгированный пероксидазой хрена в основе сыворотки со стабилизаторами. Консервант: неомицин. Розового цвета, готов к использованию.

3.2 Общие реагенты для наборов панелей T.O.R.C.H –S.T.D. и детских болезней

- **Промывочный раствор (концентрированный):** PBS-Tween 20. Консервант: тимеросал (< 0.05%). Непосредственно перед использованием, разбавьте необходимое количество 1:20 дистиллированной водой. В случае нерастворенных кристаллов, заново суспендируйте раствор, оставив флакон на несколько минут при 37°C. Хранить разбавленный промывочный раствор в течение 30 дней при 2-8^{o}C.
- **Разбавитель образца (концентрированный):** основа сыворотки со стабилизаторами, красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Непосредственно перед использованием, разбавьте необходимое количество 1:20 предварительно разбавленным промывочным раствором. Хранить разбавленный разбавитель образца в течение 30 дней при 2-8^{o}C.
- **Отрицательный контроль:** основа сыворотки, нереактивная с анти-краснухи IgG. Готовый к использованию, красного цвета. Консервант: NaN_3 (<0.1%). Сыворотка отрицательного контроля должна использоваться как: 1) контроль в качественном анализа, и 2) калибратор в точке концентрации 0 МЕ/мл количественного анализа.
- **Хромоген TMB:** Тетраметилбензидин (TMB) с цитратно-фосфатным буфером, DMSO и H_2O_2. Готовый к использованию.
- **Блокирующий реагент:** 1N H_2SO_4. Готовый к использованию.
- **Липкие пленки для планшета.**
- **Полиэтиленовый пакет.**

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Инкубатор, настроенный на 37+/-2 °C.
- Мерные колбы для разбавления образцов.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр для измерения абсорбций с интервалом 0-3,0 A при 450 и 405 нм.
- Миллиметровая графическая бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводится на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ЗАМЕЧАНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфичные реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащей загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
  - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;

- периодам инкубиции и температуре,
это может вызвать неправильные клинические результаты.

- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелостаточная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2^{0}C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержать используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.
- Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Во избежание накопления взрывоопасных азидов металла в медных и свинцовых трубопроводах реагенты необходимо удалять путем промывания водосточной трубы большим количеством воды.

6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко липемические или гемолизиррованные образцы должны быть удалены. Образцы плазмы могут содержать волокнистые вещества, которые могут повлиять на анализ; перед анализом убедитесь, что образцы всегда идеально чистые. Храните образцы при 2-8°C в течении 1 недели. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы до -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов.

Перед использованием разбавьте образцы 1:300 разведенным разбавителем образца (см. РЕАГЕНТЫ).

Пример: 10 мкл образца + 2990 мкл разведенного разбавителя образца).

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА*

- Позвольте реагентам и образцам нагреется до комнатной температуры.
- Переворачивая образцы, смешайте их перед использованием.

7.1 Приготовьте лунки для: бланка, контролей или калибраторов и образцов.
7.2 Пипетируйте соответсвующие лунки **100 мкл** контролей, калибраторов и разбавленных образцов.
7.3 Пипетируйте **100 мкл** разведенного разбавителя образца в лунку бланка.
7.4 Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **60+/-5 минут при 37+/-2^{0}C**.
7.5 Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
7.6 Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки.
7.7 Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **30+/-2 минут при 37+/-2^{0}C**.
7.8 Промойте лунки как описано в п. 7.5.
7.9 Пипетируйте **100 мкл** хромогена во все лунки.
7.10 Инкубируйте лунки в течении **10 минут при 37+/-2^{0}C или 15 минут при комнатной температуре** (18-25ºC)**.**
7.11 Пипетируйте **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
7.12 Считайте абсорбцию лунок желательно с помощью бихроматичного спектрофотометра при **450 нм** с референтной длиной волны 620 нм (настроив аппарат на 0 лункой бланка). В случае избытка значений абсорбции считайте при 405 нм. Считывание должно быть проведено в течении **15 минут** после завершения анализа.

*Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

8. СХЕМА АНАЛИЗА *(см. стр. 24 в оригинале инструкции)*.

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ*

9.1 Качественный анализ

Должна приниматься во внимание ОП каждого отрицательного контроля и cut-off калибратора (пороговое значение 15 МЕ/мл). Присутствие или отсутствие антител IgG к краснухе определяется сравнением абсорбции образца с абсорбцией cut-off контроля. Образцы с ОП ниже 15 МЕ/мл калибратора (cut-off калибратора) считаются нереактивными к антителам IgG к краснухе. Образцы с ОП выше чем в cut-off калибратора считаются реактивными к антителам IgG к краснухе.

Образцы со значениями абсорбции в пределах +/-10% cut-off калибратора считаются сомнительными и должны быть подтверждены повторным анализом.

9.2 Количественный анализ

Отрицательный контроль берется за первую точку калибровочной кривой (значение 0 МЕ/мл) и, соответственно, как часть кривой.

Выведите калибровочную кривую на линейной графической бумаге, выводя концентрации калибратора (ось x) против абсорбций, полученных для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации анти-краснухи в МЕ/мл получаются путем интерполяции абсорбции каждого образца на калибровочной кривой.

— Образцы со значениями IgG меньше 10 МЕ/мл считаются нереактивными к антителам IgG к краснухе.

— Образцы со значениями IgG больше 30 МЕ/мл считаются реактивными к антителам IgG к краснухе.

— Образцы со значениями IgG между 15 и 30 МЕ/мл считаются слабо реактивными.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, спектрофотометрическое считывание проводится автоматически при 3 различных значениях длины волны: 450, 405 и 620 нм, тем самым расширяя диапазон кривой.

9.3 Пример вычисления

Последующие значения должны рассматриваться как пример, и не должны использоваться как экспериментальные данные.

Описание	Абсорбция 450 нм	анти-ЦМВ IgG	Абсорбция 405 нм
Калибратор 0 МЕ/мл	0,015		0,005
Калибратор 15 МЕ/мл	0,309		0,103
Калибратор 30 МЕ/мл	0,591		0,330
Калибратор 60 МЕ/мл	1,280		0,426
Калибратор 120 МЕ/мл	2,170		0,723
Калибратор 240 МЕ/мл	2,898		0,966
Образец	1,280	59 МЕ/мл	0,426

Примечание: Отрицательный контроль = калибратор 0 МЕ/мл.
Путем интерполяции на калибровочной кривой образец демонстрирует для анти-краснухи IgG титр 59 МЕ/мл.

9.4 Критерии достоверности

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что абсорбции контролей находятся в пределах следующих ожидаемых значений:

Описание	Ожидаемые значения
Отрицательный контроль	< 0.200
ОП кал. 240 МЕ/мл / ОП кал. 15 МЕ/мл	> 7.8
ОП кал. 15 МЕ/мл / ОП кал. 0 МЕ/мл	> 13.8

Если полученные значения не соответствуют ожидаемым, необходимо повторить анализ.

9.5 Интерпретация результатов

— Нереактивные образцы должны считаться отрицательными к антителам IgG к краснухе.
— Реактивные и/или сомнительные образцы должны считаться положительными к антителам IgG к краснухе. .
Соответсвующие отклонения анализа крови одного и того же пациента могут быть только сравнены в одном и том же анализе. 60% варьирование абсорбции во втором образце может считаться важным указателем недавней или прогрессирующей инфекции. Если это так, проведите исследование на специфические антитела класса IgM.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность метода была оценена на группе более 100 образцов без иммунитета к инфекции краснухи. Результат составил 97.2 %.

10.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность метода была оценена на группе более 200 образцов с прошедшей инфекцией ЦМВ. Результат составил 100 %.

10.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность может быть определена как способность анализа точно обнаруживать определенный аналит в присутствии потенциально интерферирующие факторы в основе образца. Контролируемые изучения потенциально интерферирующих материй показали, что на эффективность анализа не воздействуют антикоагулянты (ЭДТА, цитрат и гепарин).

10.4 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность может также быть выражена как предел обнаружения, который является минимальным количеством определенного аналита, обнаруживаемого анализом. Предел обнаружения 0.4 МЕ/мл при 99%-ом пределе уверенности. Он был вычислен как явная концентрация аналита, отличаемая от нулевого калибратора, то есть, три стандартных отклонения выше ноля.

10.5 Точность

Точность была оценена на приборе Radim, определяющем повторяемость и воспроизводимость анализа (вариативность в пределах и между анализами) на 3 сыворотках при разных концентрациях анти-краснухи IgG.

Повторяемость (в пределах анализа)

Сыворотка	Средн.	± (МЕ/мл)	СО	КВ %	Репликаты, к-во
a	24,37		0,92	3,78	10
b	102,64		4,83	4,70	10
c	200,3		13,9	6,9	10

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн.	± (МЕ/мл)	СО	КВ %	Репликаты, к-во
a	32,10		3,83	11,90	10
b	94,26		12,33	13,10	10
c	163,47		22,47	13,70	10

11. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

В определении уровня иммунитета пациента к краснухе, наличие антител класса IgG на любом уровне не исключает возможности продолжающейся инфекции. Поэтому, анализ на специфические антитела класса IgM является важным для раннего диагноза острых инфекций. В случае болезни быстрое вмешательство значительно уменьшит риски. Однако результаты анализа должны тщательно интерпретироваться и
подтверждаться клиническими оценками и дальнейшими диагностическими исследованиями.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

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