

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ IgM ДО ІНФЕКЦІЇ ORIENTIA TSUTSUGAMUSHI

8405-25, Scrub Typhus IgM

Каталог. №: 8405-25

Методика від 11-10-2013

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



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

Для застосування тільки в дослідницьких цілях

Аналіз	Scrub Typhus IgM ELISA
Метод	Твердофазний імуоферментний аналіз
Принцип	Мембранний імуоаналіз
Діапазон визначення	Якісний: позитивний та негативний контроль
Зразок	50 мкл
Час виконання	~110 хв.
Термін придатності	12 міс.
Специфічність	Не визначена
Чутливість	Не визначена

*Лабораторні результати ніколи не можуть служити єдиною підставою для медичного висновку. Історія пацієнта та подальші дослідження повинні бути прийняті до уваги.

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір ІФА для виявлення антитіл класу IgM в сироватці людини до тифу *Orientia tsutsugamushi* (OT; колишня *Rickettsia*) із отриманого рекомбінантного антигену (1-10). Це дослідження призначене щоб допомогти в діагностиці впливу на людину видів OT. Він не призначене для скринінгу крові або її компонентів. Для застосування тільки в дослідницьких цілях.

ОПИС І ПОЯСНЕННЯ АНАЛІЗУ

(Див. в оригіналі інструкції).

ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Даний набір є якісним ІФА для виявлення антитіл класу IgM до *Orientia tsutsugamushi* (OT) у сироватці крові. лунки кожного планшету були покриті спеціальною сумішшю рекомбінантних антигенів. Під час дослідження зразки сироватки розводять розріджувачем зразка виробника та вносяться в кожну лунку. Див. нижче "Приклад застосування сироваток". Після інкубації і промивання лунки обробляються поліклональними антитілами кози до людських IgM антитіл, мічених ферментом пероксидазою хрому. Після другої інкубації і стадії промивання лунки інкубують із субстратом тетраметилбензидином (ТМБ). Потім додають кислотний стоп-розчин і ступінь ферментативної реакції визначається вимірювання оптичної щільності при 450 нм. Виміряне поглинання безпосередньо пропорційне концентрації IgM антитіл до наявного тифу OT. Набір позитивних і негативних контролів постачаються в якості внутрішніх контролів. Вони призначені для контролю цілісності компонентів набору.

МАТЕРІАЛИ

Даний набір містить достатньо реагентів для 96 лунок. Кожен набір включає наступні реагенти:

1. Планшет ІФА для визначення тифу OT:

Один тримач смужки у фользі ziplock, що містять 96 мікротитрувальних лунок із полістиролу, кожна з яких покрита рекомбінантними антигенами від OT. Стабільний при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

2. Буфер для розведення зразків:

Дві пляшки, 25 мл кожна, які будуть використовуватися для підготовки розведень зразка. Може утворюватися невеликий осад. Акуратно змішати перед використанням. Стабільний при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

3. Позитивний контроль для визначення тифу OT:

Один флакон, 30 мкл. Позитивний контроль також сприятиме контролю цілісності набору. Стабільний при 2 ° С - 8 ° С до закінчення терміну придатності. Перед використанням швидко центрифугувати флакон, так щоб вміст був зібраний на дні.

4. Негативний контроль для визначення тифу OT:

Один флакон, 50 мкл. Негативний контроль сприятиме контролю цілісності набору. Стабільний від -20 ° С до -70 ° С до закінчення терміну придатності. Перед використанням швидко центрифугувати флакон так, щоб вміст був зібраний на дні.

Примітка: при тривалому зберіганні сироватку слід додатково аліквотувати в менших об'ємах і зберігати від -20 ° С до -70 ° С.

5. Готовий до застосування ферментний кон'югат пероксидази хрому (HRP):

Одна пляшка, 12 мл попередньо розведеного кон'югату, який буде використовуватися як у наведеній нижче процедурі. Стабільний при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

6. 10X промивний буфер:

Одна пляшка, 120 мл 10x концентрату промивного буфера для розбавлення і використовується у всіх кроках цієї процедури. Стабільний при температурі 2-8°C до закінчення терміну придатності.

Примітка: Див. Підготовка реагентів у розділі Процедура дослідження щоб приготувати 1x промивного буфера.

7. Розчин для промивання:

Одна пляшка, 20 мл розчину для промивання для використання в на етапах промивання після додавання ферментного кон'югату (HRP) і перед додаванням рідкого ТМБ в цій процедурі. Стабільний при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

8. Рідкий субстрат ТМБ:

Один флакон, 12 мл рідкого субстрату, який буде використовуватися в цій процедурі. Стабільний при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

Примітка: Субстрат повинен весь час зберігатися в захищеному від світла місці.

9. Стоп - розчин:

Один флакон, 6 мл використовується для зупинки реакції. Стабільний при температурі 2-8°C до закінчення терміну придатності.

Увага: сильна кислота, надівати захисні рукавички, лабораторний халат і захисні окуляри. Утилізувати всі матеріали відповідно до правил і норм безпеки.

Примітка: Всі реагенти та контролі перед використанням повинні бути доведені до кімнатної температури (20 ° С ~ 25 ° С) і змішані акуратним перевертанням.

Необхідні матеріали, що не поставляються

1. Планшетний фотометр, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм.
2. Біологічну або вода високої очистки.
3. 37 ° С зволожуючий інкубатор без подачі CO2.
Примітка: Зволоження може бути досягнуто з використанням водяного лотка в нижній частині інкубатора.
4. Промивач планшетів.
5. Багатоканальні дозатори.
6. Таймер.

ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

1. Тільки для використання в дослідницьких цілях. Не для використання в діагностичних процедурах.
2. Всі людські матеріали, використані при підготовці контролів під час перевірки виявились негативними на антитіла до ВІЛ-1 і 2, гепатиту С і поверхневого антигену гепатиту В. Проте, жодне дослідження не може гарантувати 100 % ефективності. Таким чином, всі людські контролі та антигени слід розглядати як потенційно інфіковані матеріали. Центр контролю за захворюваннями та Національний інститут охорони здоров'я рекомендують поводитися з потенційно інфекційними носіями за рівнем біобезпеки 2.
3. Глибоке розуміння цієї інструкції необхідне для успішного використання виробу. Достовірні результати тільки будуть отримані з використанням точних лабораторних методів і чітким дотриманням інструкції користувача.
4. Не змішуйте компоненти наборів з різних партій в одному дослідженні.
5. Не використовуйте будь-який компонент після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
6. Уникайте впливу реагентів від надмірного нагрівання і впливу прямих сонячних променів під час зберігання та інкубації.
7. Деякі реагенти можуть утворювати незначні осадки, які слід акуратно перемішувати перед використанням.
8. Неповне промивання негативно позначиться на результатах аналізу і точності.

- Щоб звести до мінімуму збою в аналізі через зміну часу інкубації субстрату, слід подбати про додавання стоп-розчину в лунки в одному порядку з однаковою швидкістю додавання розчину ТМБ.
- Уникайте мікробної контамінації реагентів, особливо в готовому до застосування ферментного кон'югату-HRP для аналізу NS1. Уникайте забруднення розчину субстрату ТМБ кон'югатом-HRP.
- Носіть захисний одяг, засоби захисту очей і одноразові рукавички під час проведення аналізу. В кінці руки слід ретельно помити.
- Використовуйте чисті одноразові наконечники для кожного реагенту, стандарту, контролю або зразка.
- Накрийте робочу зону одноразовим промокальним папером.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: потенційно біологічно небезпечний матеріал

Цей набір може містити реагенти виготовлені з людської сироватки або плазми. Сироватка або плазма була інактивована теплом, якщо не вказано інше. Поводитися з усіма сироватками й наборами як такими, що містять носії інфекції. Дотримуйтесь встановлених застережень щодо мікробіологічного ризику при виконанні всіх процедур і дотримуйтесь стандартних заходів по утилізації зразків.

ХІМІЧНА НЕБЕЗПЕКА

Паспорти безпеки матеріалів (MSDS) доступні для всіх компонентів цього набору. Перегляньте всі відповідні MSDS до проведення цього аналізу. Уникайте контакту з руками і очима або слизовими оболонками під час дослідження. Якщо контакт все ж відбувається, зверніться до MSDS відносно усунення наслідків.

Забір і підготовка зразків

- Сироватка людини повинна бути використана в цьому дослідженні. Цільна кров або плазма не може бути досліджена безпосередньо.
- Відділити сироватку від згустків червоних клітин яконайскоріше, щоб уникнути гемолізу.
- Дослідження слід проводити якомога швидше після збору. Не залишайте сироватку при кімнатній температурі протягом тривалого періоду часу.
- Слід використовувати сироватку і дотримуватись стандартних запобіжних заходів при венепункції. Зразки можна зберігати при температурі 2-8 ° C протягом 48 годин або заморожувати при -20 ° C або нижче до 30 днів. Для підтримки збереженості сироватки зберігати при -70°C. Уникати повторного заморожування і відтавання зразків.
- Не використовуйте гемолізовані і ліпідні зразки.
- Заморожені зразки слід розморозити до кімнатної температури і ретельно перемішати перед використанням шляхом обережного покручування або перевертання.
- Якщо сироватки транспортуються, їх слід упакувати у відповідності з правилами, що стосуються перевезення носіїв інфекцій.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Довести всі реагенти до кімнатної температури (~ 25 ° C) і ретельно перемішати, обережно перевертаючи перед використанням. Позитивний, негативний контроль і невідомі зразки слід аналізувати в дублях.

- Визначити кількості сироватки для дослідження.
- Розташувати сироватки у відповідності до "Прикладу застосування сироваток", який наводиться нижче (тільки для скерування, ви можете створити свою власну схему). Ви можете провести розведення або в пробірках, або пластикових пробірках для ІФА (необроблений пластик; не постачається).

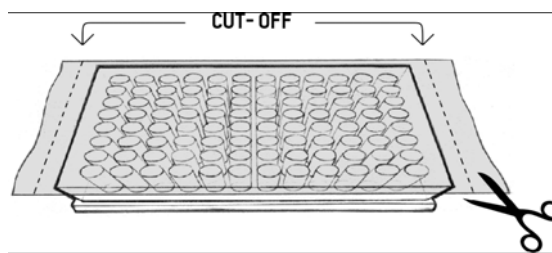
Приклад схеми розташування сироваток, розбавлених зразки 1/100, 100 мкл/лунку (Див. в оригіналі інструкції).

- Розвести сироватки для аналізу 1/100, використовуючи наданий буфер розведення зразків для даного набору (можна використовувати пропорцію: 4 мкл сироватки + 396 мкл Буфер для розведення зразка набору). Добре перемішати.

Примітка: Не використовуйте менше 4 мкл сироватки та контролю. Зверніть увагу, зразки сироватки можуть бути розведені в подальшому за допомогою розріджувачів зразків, що постачаються, наприклад, 1/300, якщо спостерігається високий фон.

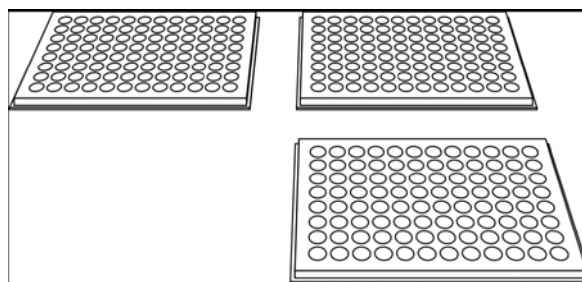
- Внести до планшету ІФА для визначення тифу по 100 мкл на лунку 1/100 розбавлених сироваток для дослідження та контроль.
- Накрити планшет парафільмом або спеціальною плівкою на рівні відкриття лунок. (Будь ласка, прочитайте важливу примітку

ниже). Інкубувати при 37 ° C протягом 30 хвилин у зволоженому інкубаторі. Зволоження може бути досягнуто з використанням водяного лотка в нижній частині інкубатора.



Примітка: Це робиться для того, щоб температура рівномірно розподілялась в усіх лунках по дну і стінках; будь-які залишки парафільму повинні бути відрізані як тільки верх запечатаний, щоб запобігти випаровуванню.

Примітка: Не складати планшети один на одного. Вони повинні бути розміщені на одному рівні. Це дуже важливо для рівномірного розподілу температури. Не слід використовувати CO₂, або будь-які інші гази, які використовуються для культивування тканини.



ПРАВИЛЬНИЙ СПОСІБ

- Після завершення інкубації промити смужки 6 (шість) разів 1X промивним буфером, використовуючи автоматичний планшет-вошер. Використовуйте 300 мкл на лунку 1X промивного буфера в кожному циклі промивання для всіх планшетів.
- Додати 100 мкл у всі лунку готового до використання ферментного кон'югату HRP для даного набору, використовуючи багатоканальний дозатор.
- Накрийте планшет парафільмом на рівні поверхні лунок. (Як описано в п. 5).
- Інкубувати планшет при 37 ° C протягом 30 хвилин в інкубаторі зі зволоженням.
- Після інкубації промити планшет 6 разів з автоматичним планшет-вошером, використовуючи 1x промивний буфер, 300 мкл на лунку.
- Додати 150 мкл на лунку розчину для промивання в усі лунки за допомогою багатоканального дозатора.
- Інкубувати планшет при кімнатній температурі (20-25 ° C) протягом 5 хвилин без накривання планшету.
- Після інкубації промити планшет 6 разів з автоматичним планшет-вошером, використовуючи 1x промивальний буфер, 300 мкл на лунку.
- Додати 100 мкл на лунку рідкого субстрату ТМБ в усі лунки за допомогою багатоканального дозатора.
- Інкубуйте планшет при кімнатній температурі (20-25 ° C) в темному місці (або контейнер) протягом 10 хвилин без накривання планшету.
- Після інкубації додати 50 мкл на лунку стоп-розчину в усі лунки за допомогою багатоканального дозатора та інкубувати при кімнатній температурі (20-25 ° C) протягом 1 хвилини без накривання планшету.

Примітка: Для отримання точних результатів слід проявляти обережність при внесенні стоп-розчину з тією ж швидкістю що й субстрату ТМБ.

17. Після інкубації зчитати значення ОЩ при 450 нм за допомогою мікротитраційного планшет-рідера. Зауваження: Не віднімати будь-який фон.

Результати

Розрахунок порогового значення (cut-off):

Розрахунок порогового значення вимагає визначення середньої ОЩ плюс трьох визначень стандартного відхилення (СВ) нормальної людської сироватки та / або сироваток людини не пов'язаних з інфекціями.

Примітка: Порогове значення не визначалось з використанням великої кількості населення. Таким чином, кінцевим користувачам рекомендовано визначати їх порогове значення, використовуючи географічно обумовлені зразки сироватки.

Інтерпретація результатів:

1. Зразки зі спектрофотометричним зчитуванням > порогового значення вважаються «реактивними», а зразки нижче цього критерію вважаються "нереактивними".
2. Будь-який "реактивний" зразок повинен бути повторений для перевірки результату. Значення близькі до порогового вважаються сумнівними, а аналіз повинен бути повторений у трьох репліках і більше.

Фактор	Допустиме значення
Негативний контроль (НК)	< 0,200
Позитивний контроль (ПК)	> 0,500
Дозволена здатність (К _{пкнкс})	≥ 5,0

Обмеження

1. Даний набір не був оцінений відносно сироваток від населення, інфікованого ВІЛ/ОТ, тому не рекомендується для цієї групи.
2. Всі позитивні результати ІФА передбачувані і вимагають підтвердження від лікаря.
3. Дослідження повинне проводитися тільки на хворих з клінічними симптомами. Цей аналіз не призначений для скринінгу населення в цілому. Позитивна прогностична цінність залежить від імовірності наявності хвороби.
4. Може мати місця серологічна перехресна реактивність по всій групі мікобактерій.
5. Позитивні результати повинні бути інтерпретовані в контексті клінічних та інших лабораторних даних і не можуть вказувати на активність тифу.
6. Результати аналізу повинні бути інтерпретовані тільки в контексті інших лабораторних даних і загального клінічного стану пацієнта.
7. Реагенти, що поставляються в цьому наборі оптимізовані для вимірювання рівня антитіл в сироватці крові, реактивних до антигенів від ОТ.
8. Повторного заморожування і розморожування реагентів, що поставляються в наборі та зразків слід уникати. Не заморожувати рідкий субстрат ТМБ.
9. Гемолізовані та ліпемічні зразки можуть призвести до помилкових значень і не повинні використовуватися.
10. Характеристики виконання аналізу не були встановлені для візуального визначення результату.
11. Результати пацієнтів з ослабленим імунітетом повинні інтерпретуватися з обережністю.
12. Загалом первинні досліджувані проявляють головним чином монотипні реакції антитіл, однак, протягом наступних інфекцій імунна реакція розширюється, включаючи гетеротипну реактивність до інших споріднених бактерій в однаковій або різних антигенних групах.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Порівняння сироватки та плазми: аналіз, описаний тут був оптимізований до сироватки. Слід бути обережним з якістю зразка. Домішки, ліпемічні та давні зразки не повинні використовуватися. Використання свіжих зразків є бажаним.

Специфічність і чутливість: специфічність і чутливість детально не були встановлені через обмежену кількість проведених досліджень.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com