

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ IgG ДО ВІРУСУ ЗАХІДНОГО НІЛУ

### 8400-25, West Nile IgG

Каталог. №: 8400-25

Методика від 11-10-2013

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



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

Дослідження	West Nile IgG ELISA
Метод	Твердофазний імуоферментний аналіз
Принцип	двоетапний ІФА типу «сендвіч»
Діапазон визначення	Якісний: позитивний, негативний контроль та калібратор
Зразок	4 мкл сироватки
Час виконання	180 хв.
Термін придатності	12 міс. з дати виробництва
Специфічність	98,4%
Чутливість	96,2%

#### ПРИЗНАЧЕННЯ

ІФА захоплення для визначення вірусу Західного Нілу (ЗН) призначений для якісного визначення IgG-антитіл до рекомбінантних антигенів (WNRA) Західного Нілу у сироватці крові людини. Це дослідження призначене для діагностики схильності до вірусу Західного Нілу. Не призначений для скринінгу крові або компонентів крові. Тільки для дослідницьких цілей. Не для використання в діагностичних процедурах.

#### ОПИС І ПОЯСНЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

(Див. в оригіналі інструкції).

#### ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Даний набір складається з двокрокового ферментативно посилюючого імуоферментного аналізу типу «сендвіч».

В цьому аналізі контролі, стандарти або невідомі зразки сироватки інкубують у мікротитраційних лунках. Зразки сироватки розводяться буфером для розведення зразків для визначення IgG до ЗН. Після другої інкубації і стадії промивки лунки інкубують субстратом тетраметилбензидину (ТМБ).

Потім додається кислотний стоп-розчин і ступінь ферментативної реакції субстрату визначається вимірюванням оптичної щільності при 450 нм. Вище певного порогу, коефіцієнт абсорбції рекомбінантного антигену ЗН та контрольних лункок попередньо визначає наявність антитіл до вірусу ЗН. Набір позитивних і негативних контролів надається для контролю цілісності компонентів набору.

#### МАТЕРІАЛИ ТА КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатню кількість реагентів для 96 лунок (12 x8). Набір включає наступні реагенти:

- Планшет ІФА для визначення людського IgG**  
Смужки, покриті козячим анти-людським IgG, що містять 96 мікротитрувальних лунок із полістиролу, кожна з яких покрита антитілами до людського IgG. Зберігати при температурі 2-8 °C до закінчення терміну придатності.
- Буфер розведення зразків для IgG**  
Два флакони (25 мл). Готовий до використання. Зберігати при 2-8 °C перед готовністю до використання.
- Позитивний контроль IgG ЗН**  
Один флакон, 50 мкл. Позитивний контроль також сприятиме контролю цілісності набору. Зберігати при 2-8 °C перед готовністю до використання. Перед використанням швидко центрифугувати пробірки для збору вмісту в нижній частині.
- 4. Негативний контроль IgG ЗН**  
Один флакон, 50 мкл. Позитивний контроль також сприятиме контролю цілісності набору. Зберігати при 2-8 °C перед готовністю до використання. Перед використанням швидко центрифугувати пробірки для збору вмісту в нижній частині.
- Готовий до застосування ферментний кон'югат пероксидази хрому (HRP) для IgG ЗН**

Один флакон (6 мл) попередньо розведеного козячого анти-людського кон'югату. Зберігати при 2-8 °C перед готовністю до використання.

- 10X промивний буфер**  
Один флакон, 120 мл промивного буферу. Зберігати при 2-8 °C перед готовністю до використання.
- Розчин для промивання**  
Один флакон (20 мл) використовується між етапами промивання після додавання ферментного кон'югату пероксидази хрому. Зберігати при 2-8 °C перед готовністю до використання.
- Рідкий субстрат ТМБ**  
Один флакон (9 мл). Готовий до використання. Зберігати при 2-8 °C перед готовністю до використання. Субстрат повинен весь час зберігатися в захищеному від світла місці.
- Стоп - розчин:**  
Один флакон (6 мл). Готовий до використання. 1N сірчана кислота. Використовується для зупинки реакції. Стабільний при 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 повинні досягти кімнатної температури (~ 25 °C) і ретельно перемішати обережним перевертанням перед використанням. Завжди дотримуватись методик стерильності та асептики на кожному етапі. Наприклад, відкрити всі реагенти в стерильному боксі, щоб уникнути забруднення повітряними бактеріями з метою подолання терміну придатності.

#### НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАВЛЯЮТЬСЯ

- Планшетний фотометр, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм.
- Біологічна або вода високої очистки.
- Планшет-вошер.
- 37 °C зволожуючий інкубатор без подачі CO<sub>2</sub>.
- Планшет-вошер.
- Мікродозатори та наконечники.
- Таймер.

#### 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 якнайшвидше, 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 до 7 днів або замороженою при -20 °C або нижче до 30 днів. Для підтримки збереженості сироватки зберігати при -70 °C. Уникати повторного заморожування і відтавання зразків.
- Не використовувати гемолізовані або ліпемічні зразки.
- Заморожені зразки слід розморозити при кімнатній температурі і ретельно перемішати обережно покручуючи або перевертаючи перед використанням. Завжди швидко покрутіть перед використанням.
- Якщо сироватки транспортуються, їх слід упакувати у відповідності з правилами, що стосуються перевезення носіїв інфекцій.

#### ПРОЦЕДУРА ДОСЛІДЖЕННЯ

Перед використанням довести всі реагенти та зразки до кімнатної температури (20 ~ 25 °C).

Ретельно перемішайте реагенти та зразки перед використанням акуратно перевертаючи.

**Примітка:** Для тривалого зберігання, всі сироватки, у тому числі експериментальні, не можуть неодноразово розморозуватись та заморожуватись. Сироватки мають бути далі аліквотовані в меншому об'ємі і зберігатись при -70 °C.

#### Підготовка дослідження:

- Підготовка 1x промивного буферу  
Розвести 10X промивний буфер 1X біологічною або високоочищеною водою (змішати 120 мл 10X промивного буферу з 1080 мл води). Після розведення до 1x зберігати при кімнатній температурі протягом максимум 6 місяців.

**Примітка:** Відмовитися від 1x промивного буфера якщо ви бачите будь-який мікробний ріст.

- Мікротитраційні лунки

Виберіть кількість лунок необхідних для проведення аналізу. Решту невикористаних лунок повинні бути поміщені назад в упаковку, герметичні закриті з осушувачем і зберігатись при температурі 2-8 °C до готовності для використання або до закінчення терміну придатності.

## ПРОЦЕДУРА

Довести всі реагенти до кімнатної температури (~ 25 °C) і ретельно перемішати, обережно перевертаючи перед використанням. Позитивний і негативний контролі слід аналізувати у двох примірниках. Досліджувані зразки можуть бути досліджені в одиночному екземплярі.

1. Позначте мікротитраційні смужки, які будуть використовуватися. **Зверніть увагу, що антигени вірусу Західного Нілу (WNRA) та контрольні антигени (NCA) вже прикріплені до планшету в тому ж порядку як відображено в наступній таблиці.**

Антиген вірусу Західного Нілу	Стрип № 1	Стрип № 2
A	WNRA	WNRA
B	WNRA	WNRA
C	WNRA	WNRA
D	WNRA	WNRA
E	NCA	NCA
F	NCA	NCA
G	NCA	NCA
H	NCA	NCA

2. У невеликій поліпропіленовій пробірці підготувати розведення зразка(ів) сироватки крові 1:300, позитивних та негативних контролів у буфер для розведення зразків для IgG.
3. Додати 50 мкл кожного розбавленого зразка сироватки в кожну лунку. Наочне розташування для одного зразка сироватки з використанням тільки одного мікротитраційного стрипу показано нижче.  
Примітка: Контролі та зразки досліджуються в лунках з WNRA та NCA.

	Стрип № 1	Стрип № 1
	Зразок сироватки	
A	Негативний контроль	Досліджуваний зразок №1
B	Негативний контроль	Досліджуваний зразок №2
C	Позитивний контроль	Досліджуваний зразок №3
D	Позитивний контроль	Досліджуваний зразок №4
E	Позитивний контроль	Досліджуваний зразок №4
F	Позитивний контроль	Досліджуваний зразок №3
G	Негативний контроль	Досліджуваний зразок №2
H	Негативний контроль	Досліджуваний зразок №1

4. Накрити стрипи та інкубувати протягом однієї години при 37 ° C у вологій камері.
5. Промити смужки шість (6) разів 1X буфером для промивання з використанням автоматичного планшет-вошера (300 мл/лунку за цикл).
6. Додати в кожну лунку 50 мкл готового до використання ферментного кон'югату-HRP.
7. Накрити смужки та інкубувати протягом однієї години при 37 ° C в інкубаторі.
8. Після інкубації, промити стрипи шість (6) разів 1X буфером для промивання з використанням автоматичного планшет-вошера.
9. Додати 150 мкл/лунку промивного буферу та інкубувати протягом 5 хвилин при кімнатній температурі (~ 25 ° C).
10. Після інкубації, промити стрипи шість (6) разів 1X промивним буфером.
11. Додати 75 мкл "Субстрату рідкого ТМБ" у кожну лунку.
12. Накрити смужки і інкубувати при кімнатній температурі (~ 25 ° C) в темному контейнері впродовж 10 хвилин.
13. Зупинити реакцію додаванням 50 мкл "Стоп-розчину" у кожну лунку.
14. Негайно зчитати планшет при 450 нм. Пересвідчитися, що мікропланшетний зчитувач HE віднімає або вирівнює всі значення бланку або лунок.

## РЕЗУЛЬТАТИ

Результати можуть відрізнятися від партії до партії. Наведені нижче результати виключно для ознайомлення.

### Аналіз даних:

Для кожного зразка та контролю обчислити середню оптичну щільність (ОЩ) двох реплік зразків з WNRA, двох реплік зразків з

NCA розрахувати коефіцієнт WNRA / NCA (співвідношення імунного статусу, або ISR).

### Критерії достовірності дослідження:

Результати, наведені в таблиці нижче, мають бути отримані з метою визначення даних дослідження: недотримання цих критеріїв є показником погіршення реагентів або помилки в процедурі дослідження, тому дослідження необхідно повторити.

Коефіцієнт	Допустимі межі
Середнє ОЩ негативного контролю у WNRA	<0.400
Середнє ОЩ позитивного контролю у WNRA	>0.400
Коеф. імунного статусу (ISR) позитивного контролю	>3.000
Коеф. імунного статусу (ISR) негативного контролю	<1.500

### Розрахунок достовірності дослідження

Обчислити середні негативного контролю WNRA з NCA:

Приклад: ОЩ негативного контролю

	WNRA	NCA
№1	0,135	0,126
№2	0,125	0,110
Всього	0,260	0,236

Середні (WNRA) =  $0,260 \div 2 = 0,130$

(NCA) =  $0,236 \div 2 = 0,118$

Обчислити співвідношення WNRA / NCA:  $0,130 \div 0,118 = 1,10$

**Будь-який коеф. негативного контролю WNRA/NCA більше 1,500 вказує, що дослідження недійсне та необхідно повторити процедуру дослідження.**

Обчислити середні позитивного контролю WNRA та NCA:

Приклад: ОЩ позитивного контролю

	WNRA	NCA
№1	0,635	0,190
№2	0,655	0,178
Всього	1,290	0,368

Середні (WNRA) =  $1,290 \div 2 = 0,645$

(NCA) =  $0,368 \div 2 = 0,184$

Обчислити співвідношення WNRA/NCA:  $0,645 \div 0,184 = 3,5$

**Будь-який коеф. позитивного контролю WNRA/NCA менше 3,000 вказує, що необхідно повторити процедуру дослідження.**

### ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Зразки з ISR > 3,0 слід вважати «Позитивними».
2. Будь-який «Позитивний» зразок повинен бути повторений для перевірки результату.
3. Зразки з ISR < 2,0 слід вважати «Негативними».
4. Зразки з ISR < 3,0, але > 2,0 слід розглядати як «Сумнівні» і повинні бути повторені у трьох репліках.
5. ISR > 2,0, що випливають з низьких ОЩ в обох WNRA та NCA лунках, необхідно вважати потенційно помилковими.

ISR	Результати	Інтерпретація
<2.0	Негативні	Не виявлено IgG-антитіл цим ІФА
2.0-3.0	Сумнівні	Потрібне підтверджуюче дослідження
>3.0	Позитивні	Вказує на присутність IgG-антитіл. Рекомендовано додаткове підтверджуюче дослідження

Помилково позитивні результати були зафіксовані при певних умовах, включаючи, але не обмежуючись пацієнтами із сифілісом. Відзначимо також, що співвідношення WNRA / NCA (ISR) > 2.0, що виникають з низької оптичної щільності (ОЩ) в обох WNRA та NCA лунках, повинні вважатись потенційними помилково позитивними. Див. Приклад № 1 в Критеріях виключення.

### Приклад № 1: Зразки із низькою ОЩ

	WNRA	NCA
№1	0,044	0,019
№2	0,016	0,007
Всього	0,060	0,026

Середні (WNRA) =  $1,060 \div 2 = 0,030$

(NCA) = 0,026 ÷ 2 = 0,013  
Обчислити співвідношення WNRA / NCA: 0,030 ÷ 0,013 = 2,31

Якщо ISR > 2,0, цей зразок має вважатися потенційним помилково позитивним завдяки низьким оптичним щільностям та високим відносним стандартним відхиленням. Це може статися, коли планшет-зчитувач віднімає відносно великі значення для "бланків". Важливо не віднімати фонів від значень оптичної щільності.

#### ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чутливість: У процесі визначення.

Специфічність: Всі лунки із вірусом ЗН в сироватці виявились позитивними при визначенні даною системою ІФА. В якості контролю були досліджені сироватки в нормі та сироватки, інфіковані іншими захворюваннями.

Вплив: Невеликий відсоток неохарактеризованих зразків плазми, що містить ревматоїдний фактор, дав ISR > 3,0 (позитивний до Західного Нілу) в аналізі ІgG.

Пацієнти, які мають вірус Сент-Луїс або японський енцефаліт можуть мати позитивний результат при визначенні дослідженням Західного Нілу.

#### ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

1. Зразки, які генерують високі оптичні щільності в контролі антигену (не WNRA), таким чином впливаючи на ISR <3,0, що може бути помилково негативним. Подальше розбавлення сироватки і повторне тестування може вказувати на достовірний ISR.
2. Так як це є непрямим методом скринінгу, наявність помилково позитивних та негативних результатів потрібно враховувати.
3. Всі реактивні зразки повинні бути оцінені підтверджуючим дослідженням.
4. Реагенти, що поставляються в цьому наборі оптимізовані для вимірювання реактивних рівнів антитіл до WNRA в сироватці або плазмі.
5. Повторного заморожування і відтавання реагентів, що поставляються в наборі та зразків, слід уникати.
6. Гемолізовані та ліпемічні зразки можуть давати помилкові значення та не повинні використовуватися.

#### ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

1. Тільки для застосування в дослідницьких цілях або для експорту.
2. Всі людські матеріали, використані при підготовці контролів під час перевірки були інактивовані теплом. 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 осади, які слід акуратно перемішувати перед використанням.
8. Неповне промивання негативно позначиться на результатах аналізу і точності.
9. 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.
10. Уникайте мікробної контамінації реагентів, особливо в готовому до застосування ферментного кон'югату-HRP для аналізу NS1. Уникайте забруднення розчину субстрату ТМБ кон'югатом-HRP.
11. Носіть захисний одяг, засоби захисту очей і одноразові рукавички під час проведення аналізу. В кінці руки слід ретельно помити.
12. Використовуйте чисті одноразові наконечники для кожного реагенту, стандарту, контролю або зразка.
13. 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 інфекцій.

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.



#### 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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)