

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ IgG ДО ІНФЕКЦІЇ ЯПОНСЬКОГО ЕНЦЕФАЛІТУ

8402-25, Japanese Encephalitis IgG

Каталог. №: 8402-25

Методика від 15-10-2013

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 співпадат.

Для застосування тільки в дослідницьких цілях

Дослідження	Japanese Encephalitis IgG ELISA
Метод	Твердофазний імуоферментний аналіз
Принцип	ІФА – непрямий; покритий антигенами планшет
Діапазон визначення	Якісний: позитивний, слабо позитивний, негативний контроль
Зразок	5 мкл сироватки
Час виконання	135 хв.
Термін придатності	12-18 міс.
Специфічність	Не визначена
Чутливість	Не визначена

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

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір ІФА для виявлення антитіл класу IgG в сироватці людини до похідного рекомбінантного антигену інфекції Японського енцефаліту (ЯЕ; JERA). Набір не призначений для скринінгу крові або її компонентів. Для застосування тільки в дослідницьких цілях. Цей набір не був оптимізований для сероконверсійних досліджень введення вакцин.

ОПИС І ПОЯСНЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

(Див. в оригіналі інструкції).

ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Даний набір складається з двокрокового ферментативно посилюючого імуоферментного аналізу типу «сендвіч». В цьому аналізі позитивний контроль IgG ЯЕ (містить реактивну або сумнівно реактивну сироватку), негативний контроль ЯЕ (містить неактивну сироватку) та невідомі зразки сироватки розводять буфером розведення для IgG, потім інкубують у мікротитраційних лунках. Після інкубації і промивання лунки обробляють антитілами, специфічними для людського IgG та мітять ферментом пероксидази хрому (HRP). 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 ЯЕ та контрольних лунок точно визначає наявність антитіл до вірусу ЯЕ.

МАТЕРІАЛИ

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

- Планшет ІФА для визначення людського IgG до ЯЕ:**
Один тримаць смужки у фользі ziplock, що містять 96 мікротитрувальних лунок із полістиролу, кожна з яких покрита рекомбінантними антигенами ЯЕ (ряд А, В, С та D) та контрольний антиген NCA (ряд Е, F, G та H). Стабільний при температурі 2-8 °С до закінчення терміну придатності.
- Буфер розведення зразків для IgG:**
Дві пляшки, 25 мл кожна, які будуть використовуватися для підготовки розведень зразка. Стабільний при температурі 2-8 °С до закінчення терміну придатності.
- Позитивний контроль IgG ЯЕ:**

Один флакон, 50 мкл. Позитивний контроль також сприятиме контролю цілісності набору. Стабільний при 2-8°С до закінчення терміну придатності.

- Негативний контроль ЯЕ:**
Один флакон, 50 мкл. Негативний контроль сприятиме контролю цілісності набору. Стабільний при 2-8°С до закінчення терміну придатності.
 - Готовий до застосування ферментний кон'югат пероксидази хрому (HRP) для IgG ЯЕ:**
Одна пляшка, 6 мл попередньо розведеного кон'югату козячого анти-людського IgG-HRP, який буде використовуватися як у наведеній нижче процедурі. Стабільний при температурі 2-8 °С до закінчення терміну придатності. **Примітка:** Субстрат повинен весь час зберігатися в захищеній від світла ємкості.
 - 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°С до закінчення терміну придатності.
 - Розчин для промивання:** Одна пляшка, 20 мл розчину для промивання для використання на етапах промивання після додавання ферментного кон'югату (HRP). Стабільний при температурі 2-8 °С до закінчення терміну придатності.
 - Рідкий субстрат ТМБ:**
Один флакон, 9 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.
 - Стоп - розчин:**
Один флакон, 6 мл використовується для зупинки реакції. Стабільний при температурі 2-8 °С до закінчення терміну придатності.
- Увага:** сильно кислота, надівати захисні рукавички, лабораторний халат і захисні окуляри. Утилізувати всі матеріали відповідно до правил і норм безпеки.

НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАВЛЯЮТЬСЯ

- Планшетний фотометр, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм.
- Біологічну або воду високої очистки.
- Вакуумний насос, планшет-вошер, інкубатор 37 °С.
- Одноканальний дозатор 1-10 мкл, одно- та багатоканальні дозатори 50-200 мкл.

ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

- Тільки для використання в дослідницьких цілях. Не для використання в діагностичних процедурах.
- 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.
- Глибоке розуміння цієї інструкції необхідне для успішного використання виробу. Достовірні результати тільки будуть отримані з використанням точних лабораторних методів і чітким дотриманням інструкції користувача.
- Не змішуйте компоненти наборів з різних партій в одному дослідженні.
- Не використовуйте будь-який компонент після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
- Уникайте впливу реагентів від надмірного нагрівання і впливу прямих сонячних променів під час зберігання та інкубації.
- Деякі реагенти можуть утворювати незначні осади, які слід акуратно перемішувати перед використанням.
- 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.
- Накрійте 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

1. Сироватка людини повинна бути використана в цьому дослідженні. Цільна кров або плазма не може бути досліджена безпосередньо.
2. Відділити сироватку від згустків червоних клітин якнайскоріше, щоб уникнути гемолізу.
3. Дослідження слід проводити якомога швидше після збору. Не залишайте сироватку при кімнатній температурі протягом тривалого періоду часу.
4. Слід використовувати сироватку і дотримуватись стандартних запобіжних заходів при венепункції. Зразки можна зберігати при температурі 2-8 °C до 7 днів або заморожувати при -20 °C або нижче до 30 днів. Для підтримки збереженості сироватки зберігати при -70°C. Уникати повторного заморожування і відтавання зразків.
5. Заморожені зразки слід розморозити при кімнатній температурі і ретельно перемішати обережно покручуючи або перевертаючи перед використанням. Завжди швидко покрутіть перед використанням.
6. Якщо сироватки транспортуються, їх слід упакувати у відповідності з правилами, що стосуються перевезення носіїв інфекцій.
7. Не використовувати якщо присутні будь-які ознаки розмноження.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Довести всі реагенти до кімнатної температури (~ 25°C) і ретельно перемішати, обережно перевертаючи перед використанням.

Примітка: при тривалому зберіганні всі сироватки не може бути повторно розморожені та заморожені. Сироватки мають бути далі аликвотовані в меншому об'ємі і зберігатись при -70 °C.

Підготовка дослідження:

- 1x промивний буфер

Розвести 10X промивного буфера 1X біологічної або високоочищеної води (змішати 120мл 10X промивного буфера з 1080мл води). Після розведення до 1x зберігати при кімнатній температурі протягом максимум 6 місяців. Використовувати 300 мкл/лунку для кожного циклу промивки.

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 ДОСЛІДЖЕННЯ

Важливо: Уважно вивчіть таблицю нижче, щоб зрозуміти постановку рекомбінантних антигенів ЯЕ (JERA) та антигенів здорової клітини (NCA). Рядки А, В, С і D покриті рекомбінантними антигенами ЯЕ, в той час як рядки Е, F, G і H покриті NCA.

Позитивні та негативні контролю слід аналізувати у дублях для обох JERA та NCA. Невідомі зразки сироватки для випробувань можуть бути проаналізовані окремо або в дублях, але повинні аналізуватись обох частинах аналізу JERA і NCA. Зверніться до блок-схеми наприкінці цього розділу для ілюстрації цієї процедури. До сорока чотирьох зразків для випробувань може бути досліджено на одному 96-лунковому планшеті.

1. Позначити покриті мікротитраційні смужки, які будуть використовуватися.
2. Розвести сироватки для дослідження, негативний контроль ЯЕ, позитивний контроль ЯЕ IgG 1/300, використовуючи наданий розчин для розведення зразків.

Примітка: Ви можете використовувати невеликі поліпропіленові пробірки для цих розведень та брати принаймні 3 мл сироватки для аналізу, а також негативного контролю ЯЕ та позитивного контролю ЯЕ IgG; наприклад, додайте 3 мл сироватки до 897 мл буферу для розведення зразків для IgG.

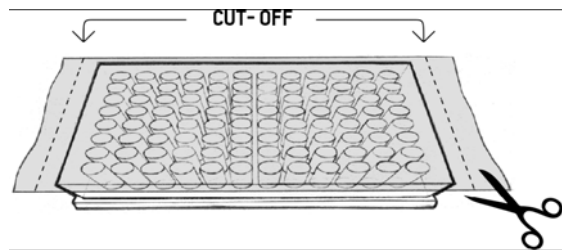
3. Додати 50 мл/лунку 1/300 розбавленої сироватки для аналізу, негативного контролю ЯЕ, позитивного контролю ЯЕ IgG в планшет багатоканальним дозатором.

Наочне розташування двадцяти двох зразків сироватки для дослідження в дублях показані нижче.

Example for Serum Sample Application												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	JE Negative Control	S#1	S#3	S#5	S#7	S#9	S#11	S#13	S#15	S#17	S#19	S#21
B	JE Negative Control	S#2	S#4	S#6	S#8	S#10	S#12	S#14	S#16	S#18	S#20	S#22
C	JE IgG Positive Control	S#23	S#25	S#27	S#29	S#31	S#33	S#35	S#37	S#39	S#41	S#43
D	JE IgG Positive Control	S#24	S#26	S#28	S#30	S#32	S#34	S#36	S#38	S#40	S#42	S#44
E	JE IgG Positive Control	S#24	S#26	S#28	S#30	S#32	S#34	S#36	S#38	S#40	S#42	S#44
F	JE IgG Positive Control	S#23	S#25	S#27	S#29	S#31	S#33	S#35	S#37	S#39	S#41	S#43
G	JE Negative Control	S#2	S#4	S#6	S#8	S#10	S#12	S#14	S#16	S#18	S#20	S#22
H	JE Negative Control	S#1	S#3	S#5	S#7	S#9	S#11	S#13	S#15	S#17	S#19	S#21

Примітка: Рядки А-Д, попередньо покриті рекомбінантним антигеном японського енцефаліту (JERA). Рядки Е-Н попередньо покриті антигеном здорової клітини (NCA).

4. Накрийте планшет парафільмом з двох сторін тільки на рівні відкриття лунок, так щоб не закрити дно лунок.



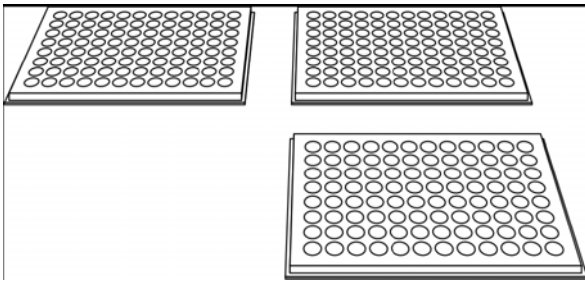
Примітка: Це робиться для того, щоб температура рівномірно розподілялась в усіх лунках по дну і стінках; будь-які залишки парафільму повинні бути відрізані як тільки верх запечатаний, щоб запобігти випаровуванню.

5. Інкубуйте планшет при 37°C в інкубаторі впродовж 1 години.

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.



НЕПРАВИЛЬНИЙ СПОСІБ



ПРАВИЛЬНИЙ СПОСІБ

- Після завершення інкубації промити смужки 6 (шість) разів 1X промивним буфером, використовуючи автоматичний планшет-вошер.
- Додати 50 мкл/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. 4).
- Інкубувати планшет при 37 °C протягом 60 хвилин в інкубаторі.
- Після інкубації промити планшет 6 разів з автоматичним планшет-вошером, використовуючи 1x промивний буфер, 300 мл 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 мл на лунку.
- Додати 75 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.
- Після інкубації зчитати значення ОЩ при 450 нм за допомогою мікротитраційного планшет-рідера. Будь ласка, переконайтеся, що мікропланшетний зчитувач не вираховує або нормалізує будь-які значення бланку або лунки.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожен набір містить позитивні і негативні контрольні сироватки. Негативний і позитивний контролю призначені контролювати істотну недостатність реагенту. Позитивний контроль не гарантує точність при пороговому значенні аналізу. Тест є недійсним і повинен бути повторений, якщо значення ISR (коефіцієнт імунного статусу) будь-якого з контролів не відповідають специфікаціям. Прийнятні значення ISR для цих контролів знаходяться в наведеній нижче таблиці. Якщо тест є недійсним, результати пацієнтів не можуть бути зафіксовані. Вимоги контролю якості повинні бути виконані у відповідності з місцевими, державним та / або федеральними правилами або вимогами акредитації та процедурами лабораторного контролю якості. Користувачеві рекомендується звернутися до директив NCCLS C24 -A та 42 CFR 493,1256 за інформацією про відповідні методи контролю якості. Результати наведені нижче тільки суто для ознайомлення. Застосовуються тільки до непідготовлених спектрофотометричних зчитувань.

Розрахунок негативного контролю: Обчислити середнє негативного контролю ЯЕ з JERA та контрольним антигеном:

Приклад: Негативний контроль ЯЕ

	ОЩ	
	JERA	NCA
№1	0,235	0,230
№2	0,245	0,224
Всього	0,480	0,454

Середнє JERA = $1.836 + 2 = 0.918$

Середнє NCA = $0.237 + 2 = 0.119$

Вирахувати коеф. JERA / NCA = $0.918 + 0.119 = 7.71$

Будь-який коеф. позитивного контролю ЯЕ JERA/NCA менше 5,0 вказує, що необхідно повторити процедуру дослідження. Невідповідність цим критеріям є показником погіршення якості

реагентів або помилкою в процедурі дослідження і аналіз слід повторити.

Коефіцієнт (для контролю аналізу)	Допустимі межі
Середнє ОЩ негативного контролю ЯЕ в JERA	<0.400
Середнє ОЩ позитивного контролю IgG ЯЕ в JERA	>0.400
Коеф. імунного статусу (ISR) позитивного контролю IgG ЯЕ	>5.000
Коеф. імунного статусу (ISR) негативного контролю ЯЕ	<1.500

РОЗРАХУНОК

Розрахунок коефіцієнту імунного статусу (ISR): обчислити середнє значення реплікацій невідомих зразків з JERA, та реплікацій з NCA, а потім розрахуйте співвідношення JERA / NCA (ISR). ISR менше 2,0 для аналізу IgG слід вважати негативним. ISR більш ніж 5,0 для аналізу IgG слід вважати позитивним. У наведеній нижче таблиці показано, як результати повинні бути інтерпретовані.

ISR	Результати	Інтерпретація
<2.0	Негативний	Не визначено IgG-антитіл цим ІФА.
2.0-5.0	Сумнівний	Потрібне підтверджуюче дослідження.
>5.0		Позитивний вказує на присутність IgG-антитіл. Рекомендується додаткове підтверджуюче дослідження.

ОБМЕЖЕННЯ

- Тільки для експорту.
- Оскільки це непрямий методом скринінгу, необхідно враховувати наявність помилкових позитивних і негативних результатів.
- Всі реактивні зразки повинні бути оцінені підтверджуючим тестом.
- Реагенти, що поставляються в цьому наборі оптимізовані для вимірювання рівня реактивних антитіл JERA у сироватці крові.
- Повторне заморожування і відтавання реагентів, що поставляються в наборі, а також і зразків, слід уникати.
- Цей набір не був оптимізований для дослідження сероконверсії введення вакцини.

ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чутливість: Чутливість цього аналізу не було встановлено.

Специфічність: Всі лунки з сироватками ЯЕ, були підтверджені як позитивні даним набором ІФА IgG до ЯЕ.

Система ІФА: В якості контролю досліджувалась певна кількість нормальних сироваток і сироваток, інфікованих непов'язаними носіями, такими як CMV, EBV і VZV. Всі отримані значення ISR були нижче порогового значення.

Перехресна реактивність набору ІФА японського енцефаліту IgG:

Досліджена позитивна сироватка	Всього зразків	Позитивний результат	Позитивний та сумнівний результат
Ревматоїдний фактор	10	1	1/8
Анти-ядерні антитіла	10	1	1/10
Цитомегаловірус (CMV)	10	0	0/10
Епштейна-Барр вірус (EBV)	15	0	0/15
Варіцелла-зостер (VZV)	10	0	0/10
Вірус Західного Нілу (WNV)	2	1	2/2
Енцефаліт Сент-Луї (SLEV)	2	1	1/2
Вірус Денге (DENV)	7	3	3/7



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

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»