

НАБІР ІФА ДЛЯ РАНЬОГО ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСУ ДЕНГЕ (DENV)

8404-25, Dengue NS1 Antigen ELISA

Каталог. №: 8404-25

Методика від 07-09-2013

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.

Аналіз	Dengue NS1 Antigen ELISA
Метод	Твердофазовий імуоферментний аналіз
Принцип	Двоступеневий імуоаналіз типу сендвіч
Діапазон визначення	Якісний: позитивний та негативний контроль
Зразок	50 мкл
Час виконання	~110 хв.
Термін придатності	12 місяців від дати виробництва
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 DAI Dengue NS1 ELISA призначений для раннього виявлення вірусу Денге (DENV) і є системою ІФА для виявлення антигену NS1 в сироватці крові людини. Цей тест допоможе в ранній діагностиці вірусу Денге в сироватці крові людини навіть до виявлення антитіл IgM або IgG. Тест не призначений для скринінгу крові або компонентів крові і призначений для використання у дослідницьких цілях. Не для використання в діагностичних процедурах.

ОПИС І ПОЯСНЕННЯ АНАЛІЗУ

(Див. в оригіналі інструкції).

ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Денге NS1 ІФА є дуже чутливим, швидким і надійним аналізом. Він використовує один ферментативно-ампліфікований "двокроковий" імуоаналіз типу сендвіч для виявлення низьких рівнів NS1 в сироватці крові.

У цьому аналізі контролі і невідомі зразки сироватки розводять в буфері для розведення зразків, що містить вторинне антитіло, і інкубують в лунках. Ці лунки були попередньо вкриті вискоєфективними NS1 антитілами і заблоковані. Після цього антигени NS1, присутні у зразках, "затискаються" між захопленням і вторинним антитілом. Присутність антигену NS1 підтверджена за допомогою колориметричної реакції, отриманої з використанням ферментного кон'югату-HRP і рідкого субстрату TMB. Після зупинки реакції додаванням кислого розчину, ферментативний перехід субстрату визначається вимірюванням оптичної щільності при 450 нм. Отримані значення негативних і позитивних сироваток є допоміжними при визначенні, якщо зразок містить антиген NS1.

Примітка: Набір негативних, позитивних і cut-off контролей використовується в якості внутрішнього контролю в цілях контролю цілісності компонентів набору.

МАТЕРІАЛИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ

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

- Попередньо вкриті смужки для Денге NS1:** Тримач смужок у фользі, що містить 96 полістиролових лунок. Зберігати при температурі 2-8 °C до закінчення терміну придатності.
- Денге NS1 Негативний контроль (1X300 мкл):** Негативний контроль сприятиме перевірці роботи набору. Зберігати при температурі 2-8 °C до закінчення терміну придатності. Центрифугувати перед використанням для осадження будь-якого осаду.
- Денге NS1 Позитивний контроль (1X300 мкл):** Позитивний контроль сприятиме перевірці роботи набору. Зберігати при температурі 2-8 °C до закінчення терміну придатності.

Центрифугувати перед використанням для осадження будь-якого осаду.

- Cut-off Контроль Денге NS1 (1X300 мкл):** Cut-off Контроль допоможе у визначенні порогового значення для ELISA. Зберігати при температурі 2-8 °C до закінчення терміну придатності. Центрифугувати перед використанням для осадження будь-якого осаду.
- Розчинник зразків для Денге NS1 (1X15 мл):** Цей розчин містить вторинні антитіла. Проклін (0,02-0,03%) додається в якості консерванту. Зберігати при температурі 2-8 °C до закінчення терміну придатності.
- Кон'югат 100x для Денге NS1 (1x150 мкл):** Містить HRP, мічену поліклональними антитілами. Добре перемішати перед використанням. Зберігати при температурі 2-8 °C до закінчення терміну придатності.
- Розчинник кон'югату для Денге NS1 (1x12 мл):** Містить розчин розріджувача для Кон'югату 100x. 100x кон'югат розбавляється безпосередньо в цьому розчині. Після розведення 100x кон'югату в цьому розчині, тепер готовий до використання кон'югат може зберігатися протягом 2 тижнів при 2-8 °C, після цього його необхідно викинути. Зберігати при температурі 2-8 °C до закінчення терміну придатності.
- 10X Промивний буфер:** Одна пляшка, 120 мл Промивного буфера для використання відповідно до вказівок в методах випробування. Зберігати при температурі 2-8 °C до закінчення терміну придатності.
- Рідкий субстрат ТМБ (1X12 мл):** Використовувати за призначенням. Зберігати при температурі 2-8 °C до закінчення терміну придатності.
Примітка: Субстрат є світлочутливим і повинен зберігатися в оригінальній пляшці.
- Стоп-розчин (1X6 мл):** Використовується для припинення реакції, як зазначено в методах випробування. Зберігати при кімнатній температурі до закінчення терміну придатності.
Увага: Це сильна кислота, надягайте захисні рукавички, маски і захисні окуляри. Утилізація всіх матеріалів відповідно до правил техніки безпеки.

Необхідні матеріали, що не поставляються

- Планшетний фотометр, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм.
- Біологічна або вода високої очистки.
- Вакуумний насос.
- Автоматичний вошер.
- 37 °C інкубатор.
- Одно каналні піпетки 1-10 мкл, одно- та багатоканальні піпетки 50-200 мкл.
- Поліпропіленові пробірки або 96-лункові планшети для розведення.
- Плівка.
- Таймер.
- Вортекс.

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 збої 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 готового 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 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 можуть бути досліджені безпосередньо.
2. Відділити сироватку від згустків червоних клітин яконайскоріше, 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 дотримуватися 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. Не використовуйте гемолізовані і ліпідні зразки.
6. Заморожені зразки слід розморозити до кімнатної температури і ретельно перемішати перед використанням шляхом обережного прокручування або перевертання.
7. Якщо сироватки транспортуються, їх слід упакувати у відповідності з правилами, що стосуються перевезення носіїв інфекції.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

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

Приготування реагентів:

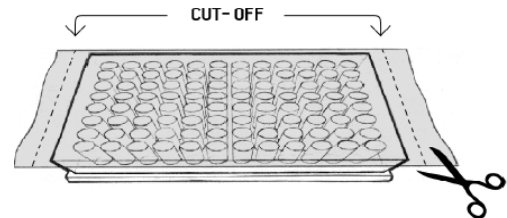
- **Підготовка Промивного буфера 1X**
Розвести 10X Промивальний буфер до 1X використовуючи біологічну або Високої очистки воду. Для підготовки 1X Промивного буфера змішати 120 мл 10X Промивного буфера з 1080 мл дистильованої (або деіонізованої води). Ретельно перемішати, щоб гарантувати, що будь-який осад розчинився і що розчин є рівномірним. Після розбавлення до 1X, розчин можна зберігати при кімнатній температурі протягом 6 місяців. Перевірте наявність забруднення до використання. Відмовтеся, якщо підозрюється забруднення.
- **Мікротитраційні лунки**
Підготувати необхідну кількість лунок для проведення аналізу. Решта невикористаних лунок негайно упакувати з доданим осушувачем і зберігати при температурі 2-8 °C до використання або закінчення терміну дії.
- **Підготовка Розчину кон'югата**
Додати 120 мкл кон'югату 100x для Денге NS1 ELISA безпосередньо до 12 мл пляшки Розчинника кон'югату для Денге NS1 (1 частина : 100 частин). Перемішати перевертанням декілька разів. Цей розчин може зберігатися до 2 тижнів, якщо зберігається при температурі 2-8 °C. Через 2 тижні викинути і більше не використовувати в цьому аналізі.

Процедура аналізу:

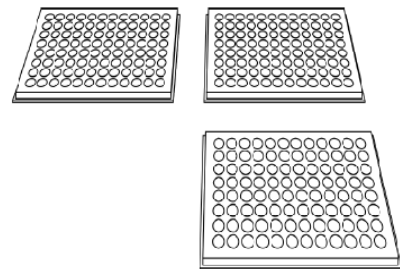
1. Позитивний, негативний і Cut-off контролю слід аналізувати в дублях (і аналізувати кожного разу, коли проводиться аналіз). Невідомі зразки сироватки можуть аналізуватися не в дублях.

2. Використовуючи одноканальні або багатоканальні дозатори, аликвотувати по 50 мкл розчинника для зразків для Денге NS1 ELISA в кожну з необхідних лунок.
3. Додати 50 мкл кожної нерозбавленої сироватки (зразки та контрольні зразки) безпосередньо в центр лунки, що містить Розчинник зразків. Потрясти планшет злегка з боку в бік 5 разів.
4. Накрити пластину плівкою і видалити надлишок.

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

5. Інкубувати при 37 °C протягом 1 години в інкубаторі.
6. Після завершення інкубації промити смужки 6 (шість) разів 1X промивним буфером, використовуючи автоматичний вошер. Використовуйте 300 мкл на лунку 1X промивного буфера в кожному циклі промивання.
7. Підготувати розчин кон'югату (120 мкл кон'югату 100x : 12 мл Розчинника кон'югату) і додати 100 мкл/лунку цього розчину кон'югату у всі лунки з використанням багатоканальної піпетки. Відмовитись від залишків розчину кон'югату або зберігати на протязі до 2 тижнів при 2-8 °C.
8. Накрити планшет парафільмом, як показано вище, і інкубувати при 37 °C протягом 30 хвилин в інкубаторі.
9. Після інкубації, промити планшет 6 разів з автоматичним вошером з використанням 1x промивного буфера.
10. Додати 100 мкл на лунку Рідкого субстрату ТМБ в усі лунки з використанням багатоканальної піпетки.
11. Інкубувати в темряві при кімнатній температурі протягом 20 хвилин.
12. Додати 50 мкл на лунку стоп-розчину в усі лунки, використовуючи багатоканальну піпетку і залишити пластину, не накриваючи кришкою, при кімнатній температурі протягом 1 хвилини.
13. Зчитати оптичну щільність при 450 нм (ОЩ₄₅₀). НЕ ВІДНІМАТИ, АБО НОРМАЛІЗУВАТИ БУДЬ-ЯКІ ЗНАЧЕННЯ БЛАНКА АБО ЛУНОК.
14. Записати реальні значення ОЩ₄₅₀ і оцінити стан зразка, як зазначено в розділі контролю якості.

Технологічна схема аналізу Dengue NS1 ІФА (Див. оригінал інструкції).

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожен комплект містить позитивні, негативні і Cut-off контрольні зразки. Прийнятна Роздільна Здатність ($R_{PC/NC}$) має бути отримана для забезпечення дійсності аналізу. Негативний і позитивний контролю призначені для контролю за значними відхиленнями в роботі реагенту. Позитивний контроль не забезпечить точність аналізу cut-off. Тест є недійсним і повинен бути повторений, якщо значення ($R_{PC/NC}$) занадто низьке або, якщо контрольні зразки не відповідають специфікаціям. Якщо тест є недійсним, результати не можуть бути використані. Вимоги до контролю якості повинні бути виконані у відповідності з місцевими, державними та/або федеральними правилами або вимогами акредитації та процедур в лабораторії контролю якості. Наведені нижче результати наведені виключно для вказаних цілей і є застосовними тільки для спектрофотометричних аналізів.

Спочатку необхідно розрахувати $R_{PC/NC}$, як показано в прикладі.

Приклад

Розрахувати середнє значення Негативного Контролю (НК):

Приклад: ОЦ Негативного контролю

№1 0.108

№2 0.084

Всього 0.192

Середнє значення Негативного Контролю = $0.192 \div 2 = 0.096$

Розрахувати середнє значення Позитивного Контролю (ПК):

Приклад: ОЦ Позитивного контролю

№1 1.112

№2 1.089

Всього 2.201

Середнє значення Позитивного Контролю = $2.201 \div 2 = 1.101$

Розрахувати відношення ($R_{PC/NC}$) між Позитивним і Негативним контролем:

Приклад: ($R_{PC/NC}$) = $1.101 \div 0.096 = 11.47$

Далі, переконайтеся, що вимоги щодо контролю якості, перераховані у таблиці нижче, виконані.

Вимоги до Контролю Якості

Control	Requirement
Positive Sample	OD \geq 0.5
Negative Sample	OD < 0.2
Cut-Off Sample	OD > Negative Sample
$R_{PC/NC}$	\geq 8

Резюме:

Результати в таблиці вище повинні бути отримані щоб аналіз вважався дійсним. Невиконання цих критеріїв вказує на погіршення реагентів або помилку в процедурі випробування і аналіз повинен бути повторений.

РОЗРАХУНКИ АНАЛІЗУ

Статус невідомого зразка визначається першим розрахунком значення Cut-off аналізу, з подальшим обчисленням відношення оптичної щільності (ОЩ₄₅₀), поділеної на значення Cut-off.

Розрахунок значення Cut-off: Значення Cut-off розраховується на основі середніх значень ОЩ, отриманих з контрольним зразком.

Приклад

Розрахувати середнє значення Cut-off Контроля:

Приклад: ОЩ Cut-off Контроля

№1 0.152

№2 0.189

Всього 0.341

Середнє значення ОЩ Cut-off Контроля = $0.341 \div 2 = 0.171$

Приклад порогового значення: 0.171

Примітка: Рекомендується перевірити значення Cut-off, використовуючи сироватки географічно відповідних груп населення.

Розрахувати Коефіцієнт Імунного Статусу (ISR): Коефіцієнт Імунного Статусу (ISR) розраховують з відношення оптичної щільності (ОЩ), отриманої з тестовим зразком, поділеної на розраховане порогове значення. Обчислити ISR для кожного зразка.

Приклад

Обчислити ISR для кожного зразка:

Приклад: ОЩ Тестового зразка

ОЩ Тестового зразка 0.431

ISR Тестового зразка = ОЩ Тестового зразка \div Порогове значення

ISR Тестового зразка = $0.431/0.171 = 2.52$

Приклад інтерпретації

Sample Status	ISR
Positive Sample	\geq 1
Negative Sample	< 1

Розрахунок Cut-off: Ендемічні контрольні сироватки не використовувались для розрахунку порогового значення. Рекомендується перевірити значення Cut-off, використовуючи сироватки географічно відповідних груп населення.

Інтерпретація результатів: Значення ОЩ \geq Значення Cut-off (ISR \geq 1), розглядаються як позитивні на наявність циркулюючих NS1 антигенів. Сироватки зі значеннями ОЩ, близькими до порогового значення ($1.1 > \text{ISR} > 0.9$) слід проаналізувати повторно в двох примірниках, щоб перевірити статус зразка.

ОБМЕЖЕННЯ

1. Так як даний метод є непрямим методом скринінгу, наявність помилкових позитивних і негативних результатів повинна бути розглянута.
2. Всі реактивні зразки повинні бути оцінені підтверджуючим тестом.
3. Реагенти, що поставляються в цьому наборі, оптимізовані для вимірювання Денге NS1 в зразках сироватки.
4. Серологічна перехресна реактивність в групі флавівірусів є розповсюдженим явищем. Деякі сироватки від пацієнтів, інфікованих японським енцефалітом, лихоманкою Західного Нілу, і/або вірусами Сент-Луїса, можуть дати неправдиві позитивні результати. Тому будь-які позитивні сироватки Денге повинні бути підтверджені з іншими тестами.
5. Характеристики виконання аналізу не були встановлені для візуального визначення результату.
6. Результати пацієнтів з ослабленим імунітетом повинні інтерпретуватися з обережністю.
7. Результати аналізу слід інтерпретувати тільки в контексті інших лабораторних даних і загального клінічного стану пацієнта.



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