

**НАБОР ИФА
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К ВИРУСУ ГРИППА
ТИПА А
В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ ИЛИ
ЦИТРАТНОЙ ПЛАЗМЕ**

Кат. № : EIA-4240
Количество тестов : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от **10-2011**
Версия **5.0**

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

2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для количественного определения антител класса IgM к Вирусу гриппа типа А в человеческой сыворотке или плазме (цитратной).

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Количественное иммуоферментное определение антител класса IgM к Вирусу гриппа типа А основано на технике ИФА.

Лунки планшета предварительно покрыты антигенами Вируса типа А для связывания с соответствующими антителами образца. После промывки лунок для удаления не связавшегося материала образца, добавляется конъюгат пероксидазы хрена – античеловеческие IgM. Этот конъюгат связывается со специфичными антителами. Сформировавшийся комплекс окрашивается добавлением ТМБ в синий цвет. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству антител в образце. Для остановки реакции добавляется серная кислота, что приводит к конечному окрашиванию в желтый цвет. Плотность считывается при 450 нм.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Поставляемые реагенты

- **Микролунокки**, покрытые антигеном Вируса гриппа типа А6 12 x 8 штук.
- **Растворитель образцов**: 1 флакон, 100 мл, рН 7.2±0.2; зеленого цвета; готов к использованию; белая крышка.
- **Стоп раствор**: 1 флакон серной кислоты, 15 мл, 0.2 моль/л; готов к использованию; красная крышка.
- **Промывочный раствор (x20)**: 1 флакон, 50 мл 20x концентрированного буфера (рН 7.2±0.2) для промывки лунок; белая крышка.
- **Конъюгат анти-IgM**: 1 флакон, 20 мл человеческих IgM, меченых пероксидазой; красного цвета; готов к использованию; черная крышка.
- **Субстратный раствор ТМБ**: 1 флакон, 15 мл ТМБ; готов к использованию; желтая крышка.
- **Положительный контроль**: 1 флакон, 2 мл; желтого цвета; готов к использованию; красная крышка.
- **Cut-off Контроль**: 1 флакон, 3 мл; желтого цвета; готов к использованию; зеленая крышка.
- **Отрицательный контроль**: 1 флакон, 2 мл; желтого цвета; готов к использованию; синяя крышка.

4.2 Поставляемые материалы

- 1 держатель полосок
- 1 пленка для заклеивания стрипов
- 1 протокол теста
- 1 план идентификации

4.3 Необходимые материалы и оборудование

- Считывающее устройство на 450/620 нм
- Инкубатор 37 °С
- Ручное или автоматическое устройство для промывки лунок
- Пипетки на 10 – 1000 мкл
- Миксер
- Деионизированная или дистиллированная вода
- Одноразовые пипетки
- Таймер

5. СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ

Реагенты стабильны до окончания срока годности, указанного на этикетке, при хранении при 2-8 °С.

6. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Очень важно привести все реагенты, образцы и контроли к комнатной температуре (20-25 °С) перед началом процедуры!

6.1 Полоски

Готовые к использованию разделяемые полоски, предварительно покрытые антигеном Вируса Гриппа типа А. хранить при 2-8 °С. полоски находятся в вакуумной упаковке.

После взятия необходимого количества полосок, немедленно вернуть их в упаковку с осушителем и хранить при 2-8 °С; стабильны до окончания срока годности.

6.2 Конъюгат

1 флакон содержит 20 мл раствора пероксидазы хрена, буфера, стабилизаторов, консервантов и инертного красного красителя. Раствор готов к использованию. Хранить при 2-8 °С.

После вскрытия стабильность сохраняется до окончания срока годности при хранении при 2-8 °С.

6.3 Контроли

Все флаконы с контролями готовы к использованию. Содержат 0.1 % Катон и должны храниться при 2-8 °С.

После вскрытия стабильность сохраняется до окончания срока годности при хранении при 2-8 °С.

6.4 Растворитель образцов

Флакон содержит 100 мл Фосфатного буфера, анти-человеческого IgG, стабилизаторов, консервантов и инертного зеленого красителя. Используется для разведения образцов. Раствор содержит антитела для исключения специфичных антител для удаления ревматоидного фактора. Раствор готов к использованию. Хранить при 2-8 °С.

После вскрытия стабильность сохраняется до окончания срока годности при хранении при 2-8 °С.

6.5 Промывочный концентрат (20x)

Флакон содержит 50 мл концентрированного буфера, детергентов и консервантов.

Развести Промывочный раствор **1+19**; например, 10 мл Промывочного Раствора + 190 мл свежей редистиллированной воды. Разведенный буфер стабилен в течение 5 дней при комнатной температуре. Кристаллы исчезают при нагревании до 37 °С на водяной бане.

После вскрытия стабильность сохраняется до окончания срока годности.

6.6 Раствор ТМБ Субстрата

Флакон содержит 15 мл ТМБ/пероксидазы гидрогена.

Реагент готов к использованию и должен храниться при 2-8 °С, вдали от света. Раствор должен быть бесцветным или иметь легкий голубоватый оттенок. Если раствор приобретает синий цвет, его необходимо выбросить.

После вскрытия стабильность сохраняется до окончания срока годности при хранении при 2-8 °С.

6.7 Стоп раствор

Флакон содержит 15 мл 0.2 М серной кислоты (R 36/38, S26). Готовый к использованию раствор хранить при 2-8 °С. *После вскрытия стабильность сохраняется до окончания срока годности.*

7. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Для данного анализа использовать образцы сыворотки или плазмы (цитратной). Если анализ будет проводиться в течение 5 дней после забора образца, образцы хранить при 2-8 °С; в противном случае образцы алиquotировать и хранить замороженными (-20 - -70 °С). если образцы хранятся замороженными, тщательно размораживать образцы перед тестированием. Избегать повторного замораживания-оттаивания. Не рекомендуется нагревание образцов.

7.1 Разведение образцов

Перед тестированием все образцы развести **1+100** с разбавителем образцов.

Поместить 10 мкл образца и 1 мл Разбавителя образцов в пробирку для получения 1+100 разведения и тщательно перемешать миксером.

8. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

8.1 Подготовка

Внимательно прочитать инструкцию перед проведением анализа. Надежность результатов зависит от строгого соблюдения протокола анализа.

Следующая процедура действительна только для ручного проведения. При проведении анализа на автоматических системах, мы рекомендуем увеличить число шагов промывания от 3 до 5 и объем промывочного раствора от 300 до 350 мкл во избежание загрязнения.

Выберите требуемое количество микротитровальных полос или лунок и поместите их в держатель.

Пожалуйста, разместите по меньшей мере:

- | | |
|-----------------------------|------------------------------|
| 1 лунку (например, A1) | для бланка субстрата, |
| 1 лунку (например, B1) | для отрицательного контроля, |
| 2 лунки (например, C1 + D1) | для cut-off контроля и |
| 1 лунку (например, E1) | для положительного контроля. |

Рекомендуется анализировать контроли и образцы в двух экземплярах.

Все шаги анализа проводить в соответствии с указанной процедурой и без задержки между шагами.

Чистые одноразовые наконечники должны использоваться для пипетирования каждого контроля и образца.

Настроить инкубатор на 37 ± 1 °C.

1. Распределить по **100 мкл контролей и разведенных образцов** в соответствующие лунки. Оставить лунку A1 для бланка субстрата.
2. Накрыть лунки пленкой, поставляемой в комплекте.
3. **Инкубировать в течение 1 часа \pm 5 минут при 37 ± 1 °C.**
4. После завершения инкубации удалить пленку, аспирировать содержимое лунок и промыть каждую лунку 3 раза, используя по 300 мкл Промывочного раствора. Избегать переливания из лунок. Время замачивания между каждым циклом промывки должно быть > 5 секунд. Вытряхнуть содержимое лунок на впитывающую бумагу, чтобы удалить остатки жидкости.
Важное примечание: Чувствительность и точность этого анализа зависят от правильного выполнения процедуры мытья!
5. Внести **100 мкл Конъюгата** в каждую лунку, за исключением A1. Накрыть пленкой.
6. **Инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре. Не подвергать воздействию прямых солнечных лучей!**
7. Повторить шаг 4.
8. Добавить **100 мкл раствора субстрата** во все лунки.
9. **Инкубировать ровно 15 минут при комнатной температуре в темноте.**
10. Распределить по **100 мкл Стоп Раствора** во все лунки в установленном порядке.
Любое голубое окрашивание, проявившееся во время инкубации, переходит в желтое.
Примечание: высоко положительные образцы могут иметь темный осадок хромогена! Они влияют на результаты считывания. Рекомендуется разведение образцов 1+1, например, с хлоридом натрия. Затем развести образец 1+100 буфером для разведения и умножить результат на 2.
11. Считать оптическую плотность при 450/620 нм с микропланшетного ридера в течение 30 минут после добавления Стоп Раствора.

8.2 Проведение измерений

Отрегулируйте ELISA ридер на нуль, используя бланк субстрат в лунке A1.

Если - по техническим причинам - ридер не может быть настроен на нуль используя бланк субстрат в лунке A1, вычесть значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции для получения достоверных результатов!

Измерить абсорбцию во всех лунках при **450 нм** и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца в плане распределения и идентификации.

Считывание на двух длинах волн, используя 620 нм как контрольную длину волны, рекомендуется.

Где возможно, посчитать **средние значения абсорбции** всех дублей.

9. РЕЗУЛЬТАТЫ

9.1 Критерии оценки анализа

Должны соблюдаться следующие условия:

- **Субстрат Бланк** в A1: значение < **0.100**

- **Отрицат. Контроль** в B1: значение < **0.200** и < **cut-off**
- **Cut-off Контроль** в C1 и D1: значение **0.150 – 1.30**
- **Положит. Контроль** в E1: значение > **cut-off**

Если эти критерии не соблюдаются, тест является не действительным и его необходимо повторить.

9.2 Подсчет результатов

Значение Cut-off – это значение средней плотности контрольных определений Cut-off.

Пример:

Значение плотности Контроля Cut-off 0.39 + значение плотности Контроля Cut-off 0.37 = 0.76

$$0.76/2 = 0.38$$

$$\text{Cut-off} = 0.38$$

9.3 Интерпретация результатов

- Образцы считаются **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ**, если значение плотности выше значения Cut-off больше, чем на 10 %.
- Образцы со значениями 10 % больше или меньше значения Cut-off должны считаться неопределенными → **СЕРАЯ ЗОНА**
Тест рекомендуется повторить через 2-4 недели со свежим образцом. Если результаты повторного тестирования опять в серой зоне, образец считать **ОТРИЦАТЕЛЬНЫМ**.
- Образцы считать **ОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ**, если значение плотности меньше 10 % значения Cut-off.

9.3.1 Результаты в единицах DRG

Значение плотности пациента (среднее) x 10 = [Единицы DRG = DU]
Cut-off

$$\text{Пример: } \frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ DU}$$

| | | |
|----------------|------|----|
| Cut-off: | 10 | DU |
| Серая зона: | 9-11 | DU |
| Отрицательный: | < 9 | DU |
| Положительный: | > 11 | DU |

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Точность

| Внутри анализа | n | Среднее значение (DU) | CV (%) |
|----------------|----|-----------------------|--------|
| Положительный | 17 | 1.18 | 4.7 |

| Между анализами | n | Среднее значение (DU) | CV (%) |
|-----------------|---|-----------------------|--------|
| Положительный | 8 | 1.18 | 3.8 |

10.2 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность указывает на возможность получения отрицательного результата при отсутствии специфического анализата. Составила > 95 %.

10.3 Диагностическая чувствительность

Диагностическая специфичность указывает на возможность получения положительного результата в присутствии специфического анализата. Составила > 95 %.

10.4 Интерференции

Интерференция с гемолитическими, липемическими или иктерическими сыворотками не наблюдалась при концентрациях до: 10 мг/мл гемоглобина, 5 мг/мл триглицеридов и 0.2 мг/мл билирубина.

Примечание: результаты относятся к образцам, которые исследовались.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Бактериальное загрязнение или повторные циклы замораживания-оттаивания образца могут повлиять на значения плотности. Постановка диагноза не должна основываться только на результатах одного анализа. окончательный диагноз должен основываться на истории болезни, симптоматике и серологических результатах.

12. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Потребители должны иметь полное понимание этой инструкции, для того чтобы успешно использовать тест. Достоверные результаты можно получить только при строгом соблюдении инструкции.
2. Только для использования в in-Vitro диагностике.

3. Все реагенты данного набора, содержащие сыворотку крови человека или плазмы, были испытаны и подтверждены как отрицательные для ВИЧ I/II, HBsAg и HCV по FDA утвержденных процедур. Все реагенты, однако, следует рассматривать в качестве потенциальных переносчиков биологической угрозы.
4. Не смешивайте различные лотовые номера составляющих теста.
5. Не использовать реагенты других производителей при проведении данного теста.
6. Не используйте реагенты, срок годности (на этикетках) которых уже вышел.
7. Чтобы избежать загрязнения реагентов, для каждого из них следует использовать новые наконечники для пипеток.
8. Во избежание перекрестного загрязнения не менять крышки на флаконах.
9. Флаконы тщательно закрывать после использования. После вскрытия конъюгата и контроля перед последующим их использованием проверить их на загрязнение.
10. Пипетировать образцы и реагенты аккуратно на дно лунок.
11. Данный тест предназначен только для использования квалифицированным персоналом.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ: В используемой концентрации Bronidox L не опасен при контакте с кожей или слизистыми!

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ: Серная кислота раздражает кожу и слизистые. Хранить подальше от детей. При контакте с газами тщательно промыть большим количеством воды и обратиться к доктору!

12.1 Утилизация

Остатки химикатов и приготовлений считаются биологическими отходами. Придерживаться установленных правил уничтожения отходов.

ЛИТЕРАТУРА (См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «**ДИАМЕБ**»
ООО «**БиоТехЛаб-С**»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 612
e-mail: www.diameb.ua
www.biotechlab-s.com.ua