



## Набор ИФА для определения антител класса IgM к инфекции *Varicella Zoster*

Кат. № : K6VM  
К-во анализов : 96  
Производитель: Radim (Италия)

Методика от 02-2008  
Версия 8.0

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

### ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

#### 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(См. в оригинале инструкции).

#### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Этот набор основан на методе иммуноферментного анализа (ИФА), где пероксидаза хрена используется как ферментный конъюгат. Во время первой инкубации, анти-ВЗ антитела IgM образца, если таковые вообще имеются, связываются с антигеном ВЗ, привитым к лункам. Цикл промывки удаляет весь несвязанный материал. В последующей инкубации второе антитело (античеловеческое IgM, конъюгированное пероксидазой хрена) связывается с комплексом антиген-антителом ВЗ. После дальнейшего цикла промывки бесцветный раствор хромогена (тетраметилбензидина, ТМБ) в субстратном буфере добавляется в лунки, где он путем реакции с ферментом пероксидазы образует соединение определенного цвета. Развитие цвета останавливается добавлением  $H_2SO_4$ . Интенсивность цвета, измеренная на спектрофотометре при 450 и 405 нм, таким образом будет непосредственно пропорциональной концентрации антител IgM анти-ВЗ в контролях и образцах.

#### 3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок.
- хранить набор при 2-8°C.
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона.
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 2 месяцев.

##### 3.1 СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ

- **Привитый микропланшет:** 1 планшет для 96 делимых лунок с привитым очищенным неактивными антигенами ВЗ. Хранить неиспользуемые лунки при 2-8°C в соответствующей полиэтиленовой сумке, тщательно закрытым.
- **Положительный контроль:** 1 флакон (2 мл) сыворотки человека, реактивной к анти-ВЗ IgM. Консервант:  $NaN_3$  (<0.1%). Готовый к использованию.
- **Пороговый (cut-off) контроль:** 1 флакон (2,5 мл) сыворотки человека, реактивной к анти-ВЗ IgM. Консервант:  $NaN_3$  (<0.1%). Готовый к использованию, синего цвета.
- **Ферментный конъюгат:** 1 флакон (14 мл) мышиноного моноклонального античеловеческого IgM, конъюгированного пероксидазой хрена, в основе сыворотки со стабилизаторами. Консервант: неомицин. Готов к использованию, розового цвета.

##### 3.2 ОБЩИЕ РЕАГЕНТЫ для наборов следующих панелей: To.R.C.H.-S.T.D., детские, гастроэнтерологические и глистные болезни

- **Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween 20. Консервант: тимеросал (<0.05%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 дистиллированной водой. В случае нерастворенных кристаллов, заново восстановите раствор, оставив флакон на несколько минут при 37°C. Хранить в течении 30 дней при 2-8°C.
- **Разбавитель образца (концентрированный):** 1 флакон (20 мл) основы сыворотки и стабилизаторов. Красного цвета. Консервант:  $NaN_3$  (<0.1%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 с предварительно разбавленным промывочным раствором. Хранить в течении 30 дней при 2-8°C.
- **Отрицательный контроль:** 1 флакон (2 мл) основа сыворотки с неактивным экстрактом антигена ВЗ IgM. Консервант:  $NaN_3$  (<0.1%). Готовый к использованию, красного цвета.

- **Хромоген:** 2 флакона (15 мл) ТМБ с цитрат-фосфатным буфером, DMSO и  $H_2O_2$ . Готовый к использованию.
- **Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N  $H_2SO_4$ . Готовый к использованию.
- **Самоклеющиеся пленки для планшета.**
- **Полиэтиленовый пакет.**

#### 4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

##### 4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Инкубатор, настроенный на 37+/-2 °C.
- Мерные колбы для разбавления образцов.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр с диапазоном 0-3,0 А, способный измерять абсорбцию при 450 и 405.
- Миллиметровая графическая бумага.
- Дистиллированная вода.

##### 4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ИФА.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ИФА.

#### 5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ЗАМЕЧАНИЯ

**Чтобы получить правильные и воспроизводимые результаты, необходимо соблюдать следующие правила:**

- Не смешивайте специфичные реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
  - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
  - периодам инкубации и температуре, это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Неполноценная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное

встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.

- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

#### Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.
- Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Во избежание накопления взрывоопасных азидов металла в медных и свинцовых трубопроводах реагенты необходимо удалять путем промывания водосточной трубы большим количеством воды.

## 6. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Умеренно липемические или гемолизированные образцы могут повлиять на результаты. Образцы плазмы могут содержать волокнистые вещества, которые могут повлиять на анализ; перед анализом убедитесь, что образцы всегда идеально чистые. Храните образцы при 2-8°C в течении 1 недели. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы до -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Перед использованием разбавьте образцы 1:300 разведенным разбавителем образца (см. РЕАГЕНТЫ). Пример: 10 мкл образца + 2990 мкл разбавителя образца.

## 7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- приведите все реагенты к комнатной температуре.

- переверачивая образец, смешайте его перед использованием.

1. Приготовьте по две лунки для контролей и по одной лунке для бланка и образцов.
2. Пипетируйте **100 мкл** контролей и разбавленных образцов в соответствующие лунки.  
**Примечание:** контроли не должны разбавляться.
3. Внесите **100 мкл** разбавленного разбавителя образца в лунку бланка.
4. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте в течении **60+/-5 минут при 37+/-2°C**.
5. Промойте лунки **3 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию жидкости из лунок.
6. Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки.
7. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте в течении **30+/-2 минут при 37+/-2°C**.
8. Промойте лунки как описано в п 7.5.
9. Пипетируйте **100 мкл** хромогена во все лунки.
10. Инкубируйте лунки в течении **10 минут при 37+/-2°C** или **15 минут** при комнатной температуре (18-25°C). Избегайте попадания прямого солнечного света.
11. Пипетируйте **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
12. Считайте ОП желательно бихроматичным спектрофотометром. При **450 нм** с референтной длиной волны 620 нм (настроен аппарат на 0 с лункой бланка) в течении **15 минут** после завершения анализа.

\* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

## 8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. в оригинале инструкции на стр. 22).

### 9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ\*

Должна приниматься во внимание ОП каждого отрицательного, положительного и порогового контроля. Наличие или отсутствие антител анти-ВЗ IgM определяется сравнением абсорбции образца с абсорбцией cut-off контроля (пороговое значения). Образцы с ОП ниже cut-off контроля считаются неактивными к антителам анти-ВЗ IgM. Образцы с ОП выше чем в cut-off контроля считаются реактивными к антител анти-ВЗ IgM.

Образцы со значениями абсорбции в пределах +/-10% cut-off контроля считаются сомнительными и должны быть подтверждены повторным анализом.

\*Используя автоматический аппарат для микропланшетов RADIM и/или SEAC, спектрофотометрические считывания будут проводится автоматически при 3 разных длинах волны: 450, 405 и 620 нм, таким образом позволяя расширить диапазон кривой.

#### 9.1 Пример вычисления

Последующие значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться как экспериментальные данные.

Описание	ОП при 450 нм
Отрицательный контроль	0,085
Пороговый контроль	0,450
Положительный контроль	1,020
Образец	0,980

Исследуемый образец оказался положительным на антитела анти-ВЗ IgM.

#### 9.2 Критерии достоверности

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что абсорбции контролей находятся в пределах следующих ожидаемых значений:

Описание	Ожидаемые значения
Отрицательный контроль	< 0.200
Положительный контроль	> 0.700

Если полученные значения не соответствуют ожидаемым, необходимо повторить анализ.

#### 9.3 Интерпретация результатов

— Нереактивные образцы должны считаться отрицательными к антителам анти-ВЗa IgM.

— Реактивные образцы должны считаться положительными к антителам анти-ВЗa IgM.

— Сомнительные образцы должны оцениваться критически, или повторены для подтверждения.

Последующие отклонения анализа крови одного и того же пациента могут быть только сравнены в одном и том же анализе. В этом случае 60% варьирование абсорбции во втором образце может считаться важным указателем недавней или прогрессирующей инфекции. Если это так, проведите анализ на специфические IgG-антитела.

## 10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

### 10.1 Клиническая специфичность

Клиническая чувствительность метода была оценена преимущественно на группе лиц, отрицательной к анти-ВЗ IgM. Результат составил 100%.

### 10.2 Клиническая чувствительность

Клиническая чувствительность метода была оценена на группе лиц с острой инфекцией ВЗ. Результат составил 100%.

### 10.3 Точность

Точность была оценена путем определения повторяемости и воспроизводимости анализа (вариабельности в пределах и между анализами) на 3 сыворотках при разных концентрациях анти-ВЗ IgM.

#### Повторяемость (в пределах анализа)

Сыворотка	Средн.	СО ОП при 450 нм	КВ (%)	К-во анализов
a	0,473	31	6,5	10
b	1,199	103	8,6	10
c	1,784	77	4,31	10

## Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн.	СО ОП при 450 нм	КВ (%)	К-во анализов
a	0,616	73,8	11,9	10
b	0,992	116	11,6	10
c	1,570	127	8,5	10

**11. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА**

В определении уровня иммунитета пациента к ВЗ наличие антител класса IgG на любом уровне не исключает возможности продолжающейся инфекции. Поэтому, тестирование специфического IgM антитела является важным для раннего диагноза острых инфекций. В случае болезни, быстрое вмешательство значительно уменьшит риски.

Обычно это исследование не проявляет влияния в ревматоидному фактору при анализе на антитела класса IgM. В этом случае каждый положительный образец должен быть проверен повторно после обработкой протеином А (код М23) и результаты анализа должны тщательно интерпретироваться и подтверждаться клиническими оценками и дальнейшими диагностическими исследованиями.

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: (0342) 775122; тел./факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)