



Крышка для накрывания микротитрационных стрипов во время инкубации.

Набор ИФА для полуколичественного и качественного определения в сыворотке и плазме антител класса IgM к краснухе

Каталог. № : RUB3045M

Количество : 96

Производитель: Orngenium Laboratories (Финляндия)

Методика от 24-09-2009

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

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор компании «Орджениум Лабораториз» **Rubella IgM Antibody EIA Test** разработан для **полуколичественного и качественного** определения специфических антител класса IgM в сыворотке и плазме к краснухе.

Настоящий анализ предназначен только для диагностического использования in vitro.

Окончательный диагноз должен быть поставлен квалифицированным врачом в контексте клинической истории пациента в сочетании с другими подтверждающими диагностическими методами при их применении.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящее исследование основано на принципе иммуноферментных анализов (ИФА). Очищенный антиген наносится на поверхность лунок микротитрационного планшета. Разбавленные образцы и контроли капают из пипетки в лунки микротитрационного планшета. Происходит закрепление между антителами класса IgM в сыворотке (или плазме) и иммобилизованным антигеном. После 30-минутной инкубации при 37°C планшет промывается разбавленным промывочным раствором, чтобы удалить несвязанный материал. Впоследствии, конъюгат пероксидазы анти-человеческого IgM добавляется и инкубируется в течение 30 минут при 37°C. После дальнейшей промывки раствора (ТМВ) субстрата капается из пипетки и инкубируется в течение 15 минут при 37°C, стимулируя развитие синего цвета в лунках. Развитие цвета прекращается добавлением стоп-раствора, который изменяет цвет от синего до желтого. Получившийся окрас измеряется спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Общее время инкубации: **75 минут**.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

- Микролуночный планшет**, 1 шт. : 12x8 лунок
Микротитрационные стрипы, помеченные определенным цветом и кодом, каждая состоящая из 8 лунок, покрытых очищенным антигеном краснухи. Цветовые и текстовые коды указывают исследуемый на стрипе патоген.
- Отрицательный контроль**, 1 флакон
Готовый к использованию.
- Положительный контроль**, 1 флакон
Готовый к использованию.
- Ферментный конъюгат****, 15 мл
Антитела к человеческому IgM, конъюгированные с пероксидазой хрена, синего цвета. Готовый к использованию.
- Раствор субстрата ТМВ**, 8 мл
Содержит раствор 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Готовый к использованию; потенциально опасен при контакте с кожей; раздражает глаза.
- Стоп-раствор ТМВ**, 8 мл
Содержит раствор 2 N серной кислоты (H₂SO₄)
Готовый к использованию; избегать контакта со стоп-раствором; он может вызвать раздражения кожи и ожоги.
- Разбавитель образцов*****, 120 мл
Готовый к использованию. Зеленого цвета.
- Промывочный буфер – концентрат**, 50 мл 20x концентрированный
После разбавления проверить pH разбавленного промывочного буфера и при необходимости довести его pH до 7,4.
- Крышка планшета**, 1 шт.

СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Все компоненты набора, кроме 20x концентрированного промывочного буфера, должны храниться при 2-8°C и использоваться до даты истечения срока годности, указанного на этикетке. Хранить 20x концентрированный промывочный буфер при комнатной температуре.
- В случае образования кристаллов в буфере, просто следует нагревать реактивную бутылку до 37°C, пока кристаллы полностью не растворятся.
- Неиспользованные стрипы должны быть помещены в мешочек, содержащий осушитель и плотно закрыты перед хранением при 2-8°C. После вскрытия стрипы стабильны пока осушитель не станет розовым.
- Разбавленный промывочный раствор может храниться в течение 1 недели при комнатной температуре или 1 месяц при 2-8°C.
- Готовый с использованием фермент, конъюгированный анти-человеческими антителами, сразу после вскрытия стабилен до окончания срока годности на этикетке. Предотвращать от загрязнения. Не возвращать неиспользованную часть конъюгированного ферментом раствор анти-человеческого IgM обратно в бутылку с исходным раствором.
- Все другие жидкие реагенты стабильны если хранить при 2-8°C, при условии, что с ними обращаются внимательно во избежание любого загрязнения окружающей среды. Прежде, чем их выбросить или обработать в автоклаве, они должны рассматриваться как потенциально инфекционные.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Должны использоваться образцы сыворотки или плазмы (ЭДТА, гепарин); соблюдать обычные предосторожности при венепункции. Образец может храниться при 2-8°C до 48 часов, но должен быть заморожен до -20°C или ниже в течение более длительного хранения.
- Необходимо избегать повторного замораживания/размораживания.
- Размороженные образцы должны быть перевернуты несколько раз перед исследованием.
- Не использовать чрезвычайно гемолизированные или липемические образцы.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ МАТЕРИАЛЫ:

- Таймер
- Вихревой смеситель (вортекс)
- Пробирки для разбавления образцов на 2 или 4 мл
- Дозаторы (3, 20, 50, 100, 500 мкл и 1 мл) и многоканальный дозатор (400 мкл)
- Одноразовые наконечники
- Инкубатор, способный к поддержанию 37±2°C
- Дистиллированная вода
- Мерные колбы для подготовки промывочного раствора
- Магнитная мешалка и дополнительная стойка для подготовки промывочного буфера
- Резервуары реагентов для многоканальных дозаторов
- Бумажные полотенца или промокательная бумага
- Микротитрационный ИФА-ридер, способный измерять абсорбцию при 450 нм.
- Микротитрационный планшет-вошер (выборочно).

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

Всем реагентам, образцам и контролям нужно позволить достичь комнатной температуры перед использованием.

1. Образцы сыворотки и плазмы

Перемешать вихревым смесителем и разбавить образцы сыворотки 1:101 готовым к использованию разбавителем сыворотки (например, 10 мкл образца + 1 мл разбавителя образца).

10 мкл сыворотки + 1 мл разбавителя образца

2. Промывочный буфер

Хорошо перемешать и разбавить концентрат промывочного буфера дистиллированной водой 1:20 (например, 50 мл концентрата + 950 мл дистиллированной воды). Если во время хранения в холодном месте образуется осадок кристаллов, концентрат нужно нагревать до 37°C в течение 15 минут. Проверить pH разбавленного промывочного буфера и если необходимо сбалансировать его pH на

уровне 7.4. Промывочный буфер стабилен 1 месяц при 2-8°C или в течение 1 недели при комнатной температуре.

50 мл концентрата промывочного буфера + 950 мл дист. воды

ВАЖНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- По крайней мере за 1 час до использования привести все реагенты, набор калибраторов и образцы к комнатной температуре (18-30°C), тщательно их перемешивая вихревым смесителем.
- Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно государственным нормам. Рекомендуется использование контрольных сывороток или плазмы, чтобы обеспечить проверку правильности относительно результатов. Использовать контроли и на нормальных и патологических уровнях.
- Периоды распределения и инкубации должны быть одинаковыми для всех лунок в том же анализе. При ручном проведении анализа использовать многоканальный дозатор.
- Как только анализ начат, все этапы должны быть завершены без прерывания. Используйте новые одноразовые пластмассовые наконечники дозатора для каждого реагента.
- Не позволять реакционным лункам высыхать в течение процедуры анализа. Это может вызвать высокие фоновые помехи в лунках бланка и ошибочные результаты.
- Если Вы не готовы к следующему этапу, или если процедура анализа неожиданно прервана, просто оставьте лунки в промывочном буфере. Однако, не более чем на 5 минут.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Подготовить образцы и разбавленный промывочный буфер** как описано выше.
 2. **Определить требуемое количество** 8-луночных стрипов. Настоятельно рекомендуется анализировать каждый образец и контроль в дубле.
- Рекомендуемое размещение контролей:**
- 2 лунки (например, А1 и В1): для бланка субстрата (100 мкл разбавителя образца)
 - 2 лунки (например, А2 и В2): для отрицательного контроля (100 мкл)
 - 2 лунки (например, А3 и В3): для положительного контроля (100 мкл)
- Остальные лунки используются для образцов пациентов.
3. Закрепить в штативе желаемое количество микротитрационных стрипов и накрыть пленкой для планшета (поставляемой). Возвратить остальные стрипы в мешочек и хранить при 2-8°C.
 4. **Раскапать по 100 мкл разбавителя образца, контролей и разбавленных образцов** в соответствующие лунки стрипов.
 5. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **30 минут при 37°C**.
 6. **Промывка:** Процедура промывки крайне важна и должна проводиться с осторожностью. Неправильная промывка может вызвать неточные результаты, такие как низкая точность и высокий фон. Промывать планшет вручную или используя автоматический планшет-вошер. При ручной промывке энергично вытряхнуть жидкость, и добавить 300 мкл разбавленного промывочного буфера. Освободить лунки, вытряхнув жидкость, чтобы удалить любые ее остатки. Повторить эту процедуру, чтобы в общем количестве составило 4 промывки. По завершении последней промывки перевернуть планшет и постучать о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки и прерывания.
 - При автоматической промывке произвести аспирацию всех лунок и промыть 4 раза **300 мкл разбавленного промывочного буфера**. Опорожнить лунки, вытряхнув жидкость, для удаления ее остатков. Повторить эту процедуру, что в общем количестве получилось **4 промывки**. После конечной промывки перевернуть планшет и постучать ним о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки или прерывания.
 - При автоматической промывке произведите аспирацию всех лунок и промойте 4 раза **300 мкл разбавленного промывочного буфера**. Постучать планшетом о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки и прерывания.
 7. Добавить последовательно по **100 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку.
 8. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **30 минут при 37°C**.
 9. **Промывка:** Промыть планшет следуя процедуре в этапе 6.
 10. **Быстро раскапать по 50 мкл** раствора ТМБ в промытые лунки.
 11. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **15 минут при 37°C**.
 12. Остановить реакцию, добавив 25 мкл стоп-раствора ТМБ в каждую лунку. Осторожно встряхнуть и считать при 450 нм в пределах **20 минут** с момента добавления стоп-раствора.

СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

Разбавленный образец 100 мкл	Ферментный конъюгат 100 мкл	Субстрат ТМБ 50 мкл	Стоп-раствор ТМБ 25 мкл
30 мин. Инкубации при 37°C.	30 мин.	15 мин.	Считать планшет

ЗНАЧЕНИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Перед началом расчета результатов убедитесь, что полученные значения для реагента бланка и контролей находятся в пределах предоставленных в Таблице 1 значений.

Таблица 1: Значения контроля качества

Образец	Ожидаемый результат
Контрольный реагент	Значение абсорбции < 0.150
Отрицательный контроль	Значение абсорбции < 0,200 *(Отриц. с соотнош. s/co < 0,8
Положительный контроль	Положительный (соотнош. s/co ≥ 1)

*s/co – абсорбция образца/пороговое значение

Результаты считаются достоверными только если значение абсорбции бланка не превышает 0,150 и значение средней абсорбции отрицательного контроля не превышает 0,200.

РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Расчет ОП порогового значения (cut-off):

$$\text{ОП Cut-off} = \text{константа Cut-off} \times (\text{ОП полож. константы} - \text{ОП отриц. константы}) *$$

Показатель константы порогового значения см. в Сертификате контроля качества, сопровождающий этот набор. Для точной интерпретации результатов обязательно использовать правильный показатель константы порогового значения.

2. Расчет соотношения s/co:

$$S/CO = \frac{\text{значение ОП образца} * - \text{ОП отрицательного контроля}}{\text{ОП порогового значения}}$$

*Настоятельно рекомендуется анализировать каждый контроль в дубле. Просьба использовать средние значения абсорбции каждого контроля/образца исходя их формул выше.

3. Схема интерпретации результатов соотношения s/co:

Соотношение s/co	Интерпретация
<0,80	Отрицательный
0,80-0,99	Сомнительный
>1	Положительный

4. Диагностическая достоверность результатов

Таблица 2: Диагностическая достоверность и интерпретация результатов.

	Результаты IgG	Результаты IgM	Интерпретация
Краснуха	Положительный или отрицательный	Положительный	Острая инфекция
	Положительный	Отрицательный	Прошедшая инфекция
	Отрицательный	Отрицательный	Антител не обнаружено

5. Полуколичественный расчет результатов анализа

Вы можете перевести значение ОП Вашего образца в ИФАЕ (иммуноферментные единицы) следующим образом:

$$\text{ИФАЕ} = S/CO \times 25$$

6. Интерпретация образцов острой фазы болезни и в состоянии выздоровления

Для определения сероконверсии необходимо сравнить значения ОП парных образцов и рассчитать следующее:

$$\% \text{ изменения} = \frac{\text{значение ОП 2го образца} - \text{значение ОП 1го образца}}{\text{Значение ОП 1го образца}} \times 100$$

7. Схема интерпретации сероконверсионных результатов

% изменения в значении ОП	Интерпретация
< 50%	Отсутствие сероконверсии. Отсутствие очевидности недавней инфекции. Рекомендуется сделать забор третьего образца и анализировать параллельно с первым образцом, чтобы наблюдать за значительным увеличением показателя ОП.
≥ 50%	Сероконверсия. В показателе ОП обнаруживается значительное увеличение. Серологический признак острой инфекции (реактивация, повторная инфекция или первичная инфекция, где образец острой фазы был собран слишком поздно, чтобы продемонстрировать сероконверсию).

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Образец Средняя абсорбция при 450 нм

Реагент бланка	0,050
Положительный контроль	1,378
Отрицательный контроль	0,068
Сыворотка образца	0,678

Пороговое значение ОП = 0,220 (1,378-0,068) = 0,228

(Примечание: показатель константы порогового значения, указанный выше 0,220 является только примером. Правильное значение для настоящего набора см. в Сертификате контроля качества).

$S/CO = 0,678 - 0,068 / 0,228 = 2,7$

Значение ИФАЕ образца : 2,7 x 25 = 67 ИФАЕ

Результат образца: положительный

Значение ИФАЕ образца: 67 ИФАЕ

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Всего 65 образцов пациентов использовалось для оценки специфичность, чувствительность и точность анализа. Результаты исследования настоящего набора были сравнены с результатами другого имеющегося в продаже набора ИФА:

Rubella IgM		Reference EIA			
		N	E	P	Total
Orgenium EIA	N	27 (D)	0	1 (B)	28
	E	0	0	0	0
	P	1 (C)	0	29 (A)	30
	Total	28	0	30	58

N = отрицательный; E = сомнительный; P = положительный Total = всего Reference EIA = референтный ИФА

Чувствительность = A / (A+B) = 29/30 = 97%

Специфичность = D / (C+D) = 27/28 = 96%

Точность = (A+D) / (A+B+C+D) = 56/58 = 97%

ИФА краснуха	IgM
Точность в анализе	4 - 8 %
Точность между анализами	2 - 9 %
Точность между сериями	3 - 11 %
Перекрестная реактивность	См. ниже**
Интерференции	Отсутствует относительно билирубина в концентрации до 0,3 мг/мл, гемоглобина до 8,0 мг/мл и триглицеридов до 5,0 мг/мл
Серологическая специфичность	96 %
Серологическая чувствительность	97 %

*Сравнение с другим имеющимся в продаже набором ИФА Rubella IgM.

****ИЗУЧЕНИЕ ПЕРЕКРЕСТНОЙ РЕАКТИВНОСТИ**

Исследование было проведено для оценки возможной интерференции наборов ИФА антиядерных антител и ревматоидного фактора с наборами Rubella IgM компании «Орджениум». Все исследуемые настоящим набором девятнадцать (19) образцов, отрицательные к антителам класса IgM исследовались имеющимися в продаже наборами ИФА, и оказались положительными для антиядерных антител (11) или РФ (8) во время исследования набором Rubella IgM компании «Орджениум».

Результаты перекрестной реактивности

Отрицательные результаты анализа во всех образцах, исследованных набора Rubella IgM компании «Орджениум» указывают на отсутствие влияния со стороны образцов, содержащих антиядерные антитела и ревматоидный фактор. (Результаты дополнительных исследований см. в оригинале инструкции).

ВНИМАНИЕ

- Отрицательный результат не исключает текущей или недавней инфекции. Если есть подозрение на острую инфекцию, второй образец сыворотки, полученный 7-14 днями позже, должен быть проверен параллельно, чтобы определить любое увеличение уровня антитела.
- Серологические результаты иммунодепрессивных пациентов должны интерпретироваться с предостережением.
- Результаты исследований, которые получены от единственного серологического образца, не должны использоваться для диагностики недавней инфекции. Соединенные образцы (острый и выздоравливающий) должны исследоваться параллельно, чтобы наблюдать за значительным повышением уровня антител.
- Если требуются сравнения с другими методами, всегда проводят оба исследования одновременно, чтобы предотвратить неожиданные результаты.
- Результаты исследований должны быть оценены в сочетании с информацией, предоставленной клиническим обследованием и другими диагностическими процедурами.
- На эффективность работы компонентов набора не влияет транспортировка при температуре окружающей среды до 5 дней (неофициальные данные).

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Настоящий набор предназначен только для диагностического использования in vitro в человеческой сыворотке или плазме квалифицированным и компетентным персоналом, выполняющим диагностические процедуры.

Если получатель настоящего набора передает его любым способом третьему лицу, эта инструкция, должна прилагаться, и вышеуказанный получатель должен под собственную ответственность обеспечить в пользу производителя все ограничения ответственности здесь изложенные.

Компания-производитель не несет ответственности за любые повреждения или потери из-за использования набора в любых случаях кроме тех, которые четко указаны в этой инструкции. Ответственность производителя ни в коем случае не должна превышать коммерческой ценности набора.

Производитель ни в коем случае не несет ответственности за косвенные, умышленные или наследственные повреждения, включая, но не ограничиваясь потерей прибыли.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
 www.diameb.ua