

Краснуха-IgM-ELA Test PKS medac

Rubella-IgM-ELA Test PKS medac

Иммуноферментный тест с системой контрольного раскапывания для IgM-антител к вирусу краснухи

Каталожный номер 135/ PKS

Только для использования in vitro

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель детского инфекционного заболевания краснухи Rubella Virus относится к семейству Togaviridae (род Rubivirus). Для Rubella Virus характерен геном, представленный одной цепью РНК, и только один серотип. В основном краснуха проявляется в детском возрасте и характеризуется легким течением, мелкопятнистой кожной сыпью и увеличением лимфатических узлов. Поражение вирусом краснухи беременных в первом триместре может быть причиной внутриутробного инфицирования с последующими необратимыми эмбриофетальными нарушениями.

Rubella IgM специфические антитела обнаруживаются на 4-30 день после высыпания на коже и циркулируют от 1 до 4 месяцев. Именно поэтому исследование с помощью Rubella-IgM-ELA Test PKS medac наиболее приемлем для диагностики "свежей" краснушной инфекции. Случается, однако, что IgM антитела могут циркулировать до года или не обнаруживаться совсем. Поэтому результаты исследования на Rubella IgM необходимо всегда сопоставлять с данными анамнеза.

Кроме

Rubella-IgM-ELA Test PKS medac

Кат. № 135/PKS для 96 определений

предлагается также

Rubella-IgG-ELISA Test PKS medac

Кат. № 136/PKS для 96 определений

ПРИНЦИП ТЕСТА

Планшет покрыт анти-человеческим иммуноглобулином IgM.

Добавляется сыворотка, и IgM селективно связывается с лункой.

Комплекс mAb-пероксидаза-конъюгат/вирус краснухи-антиген связывается со специфическими антителами IgM к вирусу краснухи.

Инкубация с ТМВ-субстратом. Реакция останавливается добавлением стоп раствора. Абсорбция окрашенного комплекса считывается фотометрически.

Преимущества теста:

- не наблюдается неспецифических реакций и ложноположительных результатов, вызываемых ревматоидным фактором;
- не происходит блокировки антител IgM высокими титрами IgG;
- тест может быть автоматизирован;
- каждый этап пипетирования можно контролировать визуально при помощи PCS (Система Контроля за Раскапыванием), при помощи цветовых изменений.
- Ломающиеся стрипы позволяют использовать набор с большей эффективностью.

1. КОМПОНЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В НАБОР:

№ по каталогу 135/PKS

1. Микропланшета: 12x8 лунок (с рамкой и поглотителем влаги), разламывающихся, U-образных, покрытых козым античеловеческим иммуноглобулином IgM и индикатором pH, готовых к использованию.
2. Отрицательный контроль: 2 флакона емкостью 0,75 мл каждый, человеческая сыворотка, готовая к использованию, содержит фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат.
3. Положительный контроль: 2 флакона емкостью 0,75 мл каждый, человеческая сыворотка, готовая к использованию, содержит фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат.
4. Промывочный буфер: 1 флакон емкостью 100 мл, PBS/Tween, концентрация 10x, содержит Проклин 300.
5. Растворитель образца: 1 флакон емкостью 110 мл, PBS/Tween/BSA, pH 7,2 – 7,4, готов к использованию, содержит Проклин 300.
6. Растворитель антигена: 1 флакон с 14 мл Tris/хлорида натрия, готовый к использованию, содержит Проклин 300.
7. Антиген: 4 флакона емкостью 3,0 мл каждый, BSA, лиофилизированный.
8. Конъюгат: 1 флакон емкостью 0,3 мл, содержит мышинные моноклональные антитела к вирусу краснухи, окрашен в красный цвет, HRP-конъюгированный, готов к использованию, содержит фенол, Проклин 300 и гентамицин.

9. ТМБ-субстрат: 1 флакон емкостью 10 мл, готовый к использованию.
 10. Стоп-раствор: 2 флакона по 14 мл в каждом, готов к использованию.

1. ХРАНИЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ

Материал/ реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Тест-набор	закрытый	2... 8 С	до истечения срока годности
Микро планшеты	закрытые	2... 8 С	до истечения срока годности
	открытые	2... 8 С в пакете с влажной прокладкой	6 недель
Контроли	открытые	2... 8 С	6 недель
Промывочный буфер	разведенный	2...8 С	6 недель
Растворитель образца	открытый	2...8 С	6 недель
Растворитель антигена	открытый	2... 8 С	6 недель
Антиген - конъюгат	разведенный	2...8 С	1 неделя
Субстрат	открытый	2... 8 С	6 недель
Стоп-раствор	открытый	2...8°C	до истечения срока годности

Не используйте реагенты после истечения срока годности.

2. НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

- 2.1 Рекомендуется использовать би-дистиллированную воду, т.к. деионизированная вода может повлиять на результаты теста;
- 2.2 Микропипетки с изменяемым объемом.
- 2.3 Чистые стеклянные или пластиковые сосуды для разведения моющего буфера и образцов.
- 2.4 Оборудование для промывания микропланшет (мультистеппер или вошер).
- 2.5 Инкубатор на 37°C.
- 2.6 Микропланшетный ридер с фильтрами на 450 нм и 620-650 нм.

3. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Рекомендуется начинать работу по достижении всеми компонентами теста комнатной температуры во избежание образования конденсата. Определите количество лунок, необходимых для работы.

3.1. Микропланшеты

Рекомендуется герметично запаковывать пакеты из фольги вместе с поглотителем влаги после изъятия необходимого количества лунок. Стабильность стрипов, хранящихся должным образом, приведена в таблице 1.

Внимание! Лунки планшеты имеют светло-зеленый цвет. Изменение цвета до зеленовато-коричневого не оказывает влияния на результаты теста.

3.2. Промывочный буфер (=10 мл/стрип, 8 лунок)

Перемешайте один объем буфера с 9 объемами би-дистиллированной воды (т.е. 50 мл буфера и 450 мл воды).

3.3. Раствор антиген-конъюгат

Растворите лиофилизированный антиген с помощью 3,0 мл растворителя антигена, осторожно перемешайте. Убедитесь, что верхние частички тоже растворились. Добавьте 50 мкл конъюгата к 3,0 мл растворенного антигена за 60 минут до использования.

Внимание! После растворения и добавления конъюгата раствор антиген-конъюгат должен иметь красный цвет. Он готов к использованию. Готовый к использованию антиген-конъюгат должен храниться при температуре 2-8 °C в течение 1 недели. Внимание! Не замораживать!

Не смешивайте компоненты из наборов разных серий или наборов разных производителей! В то же время разбавитель образцов, моющий буфер, ТМБ –субстрат и стоп-раствор взаимозаменяемы во всех наборах Medac для определения вирусных инфекций.

Надежные и воспроизводимые результаты могут быть достигнуты только при тщательном соблюдении инструкции и правильном использовании реагентов.

4. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

- 4.1. В тесте могут быть использованы образцы сыворотки.
- 4.2 Предварительная обработка образцов, т.е. инактивация, необязательна. Образцы не должны быть контаминированы микроорганизмами и не должны содержать красные кровяные тельца.
- 4.3. Образцы должны быть разведены в пропорции 1:100 с помощью буфера для разведения образцов. Возможно дальнейшее разведение образцов для определения титров вируса краснухи.

5.А. ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

- 5.1 Разрежьте пакет из фольги выше линии склеивания и достаньте необходимое количество стрипов.

Стрипы готовы к использованию, нет необходимости в предварительной промывке лунок.

5.2. Оставьте лунку A1 пустой (для использования ее в качестве бланка). Добавьте в лунки по 50 мкл каждого из разведенных образцов, а также негативный и положительный контроли в дубле.

Внимание! Каждая лунка (кроме A1), в которую был раскапан образец или контроли, должна окраситься в темно-голубой цвет. Если этого не произошло в какой-либо из лунок, это означает, что образец или контроль не были раскапаны.

5.3. Инкубируйте планшеты в течение 1 часа (± 5 мин) при температуре 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) во влажной камере (или заклеенными инкубационной пленкой).

5.4. Приготовьте раствор антигена с конъюгатом.

5.5. После инкубации трижды промойте каждую лунку 200 мкл промывочного буфера. Убедитесь, что все лунки заполняются во время процедуры промывки. После промывки вытряхните планшеты на фильтровальную бумагу.

Не позволяйте лункам высохнуть! Используйте незамедлительно!

5.6. Раскапайте 50 мкл раствора антиген-конъюгат (окрашен в красный) в каждую лунку планшеты, за исключением A1. **Помните! При использовании автомата, ввиду повышенного испарения в инкубационной камере, необходимо раскапывать по 60 мкл антиген-конъюгата в каждую лунку.**

5.7. Инкубируйте снова в течение 1 часа (± 5 мин) при температуре 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) во влажной камере (или заклеенными инкубационной пленкой).

5.8 После инкубации промойте лунки снова, как это было предписано пунктом 5.5.

5.9. Раскапайте 50 мкл раствора субстрата в каждую лунку (в том числе A1) и инкубируйте 30 минут (+2 мин) при температуре 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) во влажной камере или заклеенными инкубационной пленкой в темноте.

5.10. Остановите реакцию при помощи раскапывания 100 мкл 0,5 М H₂SO₄ в каждую лунку. Положительные образцы окрасятся в желтый цвет.

Прочистите микропланшеты снизу перед фотометрическим считыванием и убедитесь, что в лунках нет воздушных пузырей. Фотометрическое считывание необходимо произвести в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

5.Б. ТАБЛИЦА РАБОЧЕЙ ПРОЦЕДУРЫ ТЕСТА

	Бланк (A1)	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Образец
Отрицательный контроль	-	50 мкл	-	-
Положительный контроль	-	-	50 мкл	-
Образец	-	-	-	50 мкл
Инкубируйте в течение 1 часа при температуре 37°C во влажной камере (или при закрытой крышке инкубатора), промойте 3 раза 200 мкл промывочного буфера.				
Раствор антигена с конъюгатом	-	50/60 мкл*	50/60 мкл*	50/60 мкл*
Инкубируйте в течение 1 часа при температуре 37°C во влажной камере (или при закрытой крышке инкубатора), промойте 3 раза 200 мкл промывочного буфера.				
ТМВ-субстрат	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C в темноте.				
Стоп-реактив	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Фотометрическое считывание при длине волны 450 nm. (референс-значение 620-630 nm).				

*) ручная/автоматическая процедура (см. пункт 5.6.)

6.А. ВАЛИДНОСТЬ ТЕСТА

■ Считайте значения ОП при длине волны 450 nm (референс-значение 620-650 nm).

■ Вычтете значение ОП бланка (лунка A1) из остальных значений ОП.

■ Среднее значение ОП отрицательного контроля должно быть $<0,100$.

Среднее значение ОП положительного контроля должно быть $>0,800$.

• **величина cut-off** = Среднее значение ОП отриц. контроля + 0,320

Серая зона = cut-off $\pm 10\%$

6.В. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

■ Образцы со значениями ОП ниже нижней границы серой зоны считаются отрицательными.

■ Образцы со значениями ОП в пределах серой зоны считаются не интерпретируемыми. Они должны быть протестированы еще раз вместе со свежеполученным (через 14 дней) образцом с целью выявления повышения или понижения титров IgM.

■ Образцы со значениями ОП, превосходящими верхнюю границу серой зоны, считаются положительными.

■ Результаты исследования всегда должны сопоставляться с клиническими данными.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

7.А. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Были протестированы сыворотки от здоровых доноров и от пациентов с антителами IgM к другим вирусам (ЦМВ, ВЗВ, ЭБВ, Парвовирус В19), а также сыворотки, содержащие ревматоидный фактор, и результаты тестирования сравнены с результатами других тестов. Были выявлены два из 352 образцов, оказавшиеся неподтвержденными положительными. Диагностическая специфичность - 99,14%.

7.Б. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Из 100 сывороток от пациентов с подозрением на острую инфекцию краснухи и положительными результатами, полученными на других тест-системах, одна оказалась отрицательной. Диагностическая чувствительность – 99,03%.

7.С. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нижеприведенная таблица суммирует внутри- и вне-тестовую воспроизводимость Rubella IgM ELA test PCS medac при использовании образцов с разными уровнями титров антител IgM.

Образец	Вне-тестовая вариабельность				Образец	Внутри-тестовая вариабельность			
	Средняя ОП	СП	ВК%	n		Средняя ОП	СП	ВК%	n
NM	0,025	0,004	16,9	18	NM	0,024	0,005	19,2	11
PM	1,235	0,031	2,5	21	PM	0,962	0,057	5,9	11
1	1,4	0,036	2,6	21	4	0,922	0,054	5,8	11
2	0,93	0,026	2,8	21	5	0,23	0,008	3,4	11
3	0,488	0,019	3,9	21	1	1,159	0,066	5,7	11
					3	0,426	0,035	8,2	11

NG - отрицательный контроль

PG - положительный контроль

ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

- Не путать флаконы с реагентами и их крышки, чтобы избежать перекрестной контаминации.
- Флаконы с реагентами сразу же после использования снова закрыть, чтобы избежать испарения и микробиологического заражения.
- После использования реагентов хранить в соответствии с предписаниями по хранению (см. 1), чтобы обеспечить заданный срок годности.

Указания по технике безопасности

- Следует соблюдать соответствующие правила для лабораторий и предписания по технике безопасности.
- Не раскапывать ртом.