

Краснуха-IgG-ИФА СКР medac

Иммуноферментный тест с системой контрольного раскапывания для количественного определения IgG-антител к вирусу краснухи

Каталожный номер 136/ PKS

Только для использования in vitro

1. КОМПОНЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В НАБОР:

№ по каталогу 136/PKS

1. Микропланшета: 12x8 лунок (с рамкой и поглотителем влаги), разламывающихся, U-образных, покрытых антигеном вируса краснухи и индикатором pH, готовых к использованию.
2. Отрицательный контроль: 2 флакона емкостью 0,75 мл каждый, человеческая сыворотка, готов 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. Калибратор: 2 флакона емкостью 0,75 мл каждый, человеческая сыворотка, готов к использованию, содержит фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат.
5. Промывочный буфер: 1 флакон емкостью 100мл, PBS/Tween, концентрация 10x, pH 7.2-7.4, содержит Проклин 300.
6. Растворитель образца: 1 флакон емкостью 110 мл, PBS/Tween/BSA, pH 7.2-7.4, готовый к использованию, содержит Проклин 300.
7. Конъюгат: 3 флакона емкостью 5.0 мл, содержит козий анти-человеческий иммуноглобулин IgG, HRP-конъюгированный, окрашен в зеленый цвет, готовый к использованию, содержит фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат.
- 8 ТМБ-субстрат: 1 флакон емкостью 10 мл, готовый к использованию.
9. Стоп-раствор: 2 флакона по 14 мл, готов к использованию.

1.ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ

Материал/ реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Тест-набор	закрытый	2... 8 С	до истечения срока годности
Микропланшеты	открытые	2... 8 С в пакете с влажной прокладкой	6 недель
Контроли/ Калибратор	открытые	2... 8 С	6 недель
Промывочный буфер	разведенный	2...8 С	6 недель
Растворитель образца	открытый	2...8 С	6 недель
Конъюгат	открытый	2... 8 С	6 недель
Субстрат (ТМБ)	открытый	2... 8 С	6 недель
Стоп-раствор	открытый	2... 8 С	до истечения срока годности

Не используйте реагенты после истечения срока годности.

2. 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 влияет на результаты теста.

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

Концентрированный промывочный буфер необходимо довести до комнатной температуры для растворения всех кристаллов. Перемешайте один объем буфера с 9 объемами би-дистиллированной воды (т.е. 50 мл буфера и 450 мл воды).

Не смешивайте компоненты из наборов разных серий или наборов разных производителей!

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 и спинномозговой жидкости (СМЖ, см п.8).
- 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 1:200 с помощью буфера для разведения образцов. Рекомендуется приготовить начальное разведение 1:50 (т.е. 10 мкл сыворотки + 490 мкл разбавителя образцов). Для дальнейшего разведения 1 : 4 приготовьте необходимый объем. Образцы, выходящие за измеренную область разводятся больше.
- 4.4. Диагностическое исследование сыворотка-СМЖ в паре описано в пункте 8.

5.A. 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 А1 пустой (для использования ее в качестве бланка). Добавьте в лунки по 50 мкл каждого из разведенных образцов, а также отрицательный и положительный контроли и калибратор в дубли.

Внимание! Каждая лунка (кроме А1), 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 планшету в течение 60 мин (+- 5 мин) при температуре 37°C (+-1 °C) во влажной камере (или заклеенной инкубационной фольгой).

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

Не позволяйте лункам высохнуть! Используйте немедленно!

- 5.5 Раскапайте 50 мкл окрашенного в зеленый цвет конъюгата в каждую лунку планшеты, за исключением А1.

50 мкл конъюгата пипетируется в лунки если тест проводится в ручную.

При автоматической постановке (имеется ввиду полный автомат), в лунки пипетируется 60 мкл конъюгата ввиду повышенного испарения в инкубационной камере.

- 5.6. Инкубируйте стрипы снова в течение 1 часа (+2 мин) при температуре 37°C (+-1 °C) во влажной камере (или заклеенными инкубационной фольгой).

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

- 5.8. Раскапайте 50 мкл раствора субстрата в каждую лунку (в том числе А1) и инкубируйте 30 минут (+2 мин) при температуре 37°C (+-1 °C) в темноте. Положительные образцы приобретут голубую окраску.

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

Прочистите микропланшету снизу перед фотометрическим считыванием и убедитесь, что в лунках нет воздушных пузырей. Считывание производится в течении 15 минут после добавления стоп-раствора.

5.B. ТАБЛИЦА РАБОЧЕЙ ПРОЦЕДУРЫ ТЕСТА

	Бланк (А1)	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Калибратор	Образец
Отрицательный контроль	-	50 мкл	-	-	-
Положительный контроль	-	-	50 мкл	-	-
Калибратор	-	-	-	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 конъюгата	-	50/60* мкл	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	50 мкл
Инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C в темноте.					
Стоп-реактив	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Фотометрическое считывание при длине волны 450 nm (референс-значение 620-650 nm).					

*ручная/автоматическая процедура

6.A. Вычисление результатов (ВАЛИДНОСТЬ ТЕСТА)

- Считайте значения ОП при длине волны 450 nm (референс-значение 620-650 nm).
- Вычтите значение ОП бланка (лунка A1) из остальных значений ОП.
- Сведения, специфичные для данной серии, прилагаемые к набору содержат следующую информацию:
 - стандартная кривая, специфичная для данной серии;
 - параметры кривой a и b (уравнение);
 - уровень ОП калибратора
 - нижняя граница ОП калибратора
 - уровень концентрации положительного контроля (межд.ед/мл)

● КРИТЕРИИ ВАЛИДНОСТИ

- Среднее значение ОП отрицательного контроля должно быть **<0.150**
- Значения положительного контроля должны укладываться в номинальный уровень значений на листе с лот-специфичными данными.
- Среднее значение ОП калибратора должно быть выше нижней границы ОП на листе с лот-специфичными данными.
- Дополнительные критерии валидности для определения сыворотка-СМЖ в паре отражены в п.8.

Если результаты не соответствуют этим условиям, повторите исследования.

● Коррекция полученных результатов

Полученный уровень ОП положительного контроля и образцов необходимо корректировать следующим образом:

ОП образца после коррекции = $\frac{\text{ОП калибратора (специфичная для данной серии)}}{\text{ОП калибратора (полученная)}} \times \text{ОП образца}$

● Подсчет результатов

Используя скорректированный уровень ОП положительного контроля и образцов подсчитать их соответствующие концентрации (межд.ед/мл), используя кривую, специфичную для данной серии. Альтернативно, концентрация может быть рассчитана по формуле:

Концентрация (межд.ед/мл) = $b / \left(\frac{a}{\text{ОП кор.} - C} - 1 \right)$

Исследуемая область составляет от 5 до 200 межд.ед./мл. Образцы со значениями ниже интерпретируются как < 5 межд.ед/мл, выше-как > 200 межд.ед/мл. Данные значения не должны экстраполироваться.

cut off = 15 ед.

серая зона = cut off ± 20% (= 12 - 18 ед.)

6.B. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Образцы со значениями ниже уровня cut off (15 межд. ед/мкл) считаются негативными по отношению к существующему иммунитету.
- Образцы со значениями в пределах серой зоны считаются сомнительными. Такие образцы должны быть протестированы снова вместе со свежими образцами через 14 дней для определения изменения титра.
- Образцы со значениями выше уровня cut off (15 межд.ед/мкл) считаются положительными.
- Результаты исследования всегда должны сопоставляться с клиническими данными.

Очень высокие концентрации липидов в положительных образцах могут изменить измеренные концентрации антител.

Высокие концентрации гемоглобина и билирубина не влияют на результаты теста.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

7.A. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Специфичность = 99%

С целью установления диагностической специфичности 100 сывороток, отсутствие инфицирования вирусом краснухи предварительно подтвержденных реакцией торможения гемагглютинации, протестированы Rubella-IgG-ELISA Test PKS medac. Значение ОП одного образца оказались в пределах серой зоны.

7.B. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Чувствительность = 100%

С целью установления диагностической чувствительности 250 сывороток, позитивность которых в отношении вируса краснухи была подтверждена тест-системами других производителей, протестированы Rubella-IgG-ELISA Test PKS medac. Все положительные результаты были подтверждены.

7.C. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нижеприведенная таблица суммирует внутри- и вне-тестовую воспроизводимость Rubella-IgG-ELISA Test PKS medac.

Образец	Вне-тестовая вариабельность	Образец	Внутри-тестовая вариабельность
---------	--------------------------------	---------	-----------------------------------

	Средняя СП ОП	ВК%	n		Средняя СП концентрация (межд.ед)	ВК%	n
NG	0,025	0,003	12,4	22	PG	44,1	4,5 10,3 11
PG	1,536	0,032	2,1	24	1	70,4	9,5 13,5 11
Калиб ратор	0,75	0,026	3,5	24	2	32,8	2,7 8,3 11
1	1,884	0,05	2,7	22	3	16,2	0,8 5 11

NG - отрицательный контроль

PG - положительный контроль

8. Диагностическое исследование спинномозговой жидкости.

Обнаружение Rubella-специфичных антител в ЦНС вследствие диагностического исследования спинномозговой жидкости является важным фактором дифференциальной диагностики острой и хронической инфекции, поражающей ЦНС.

Кроме грибов и бактерий, существуют многочисленные вирусы, которые могут быть ответственны за поражение ЦНС, и, кроме того, в хронических заболеваниях, таких как рассеянный склероз, высокий индекс антител к кори, краснухе и ветряной оспе обнаруживается практически в 90% всех случаев.

Определение синтеза Rubella-специфичных интраккальных антител производится посредством вычисления индекса антител (A1), предложенное Райбером (Reiber 1987, 1999).

Чтобы подсчитать A1 необходимо выполнить следующие условия:

Для оценки функции гемато - энцефалического барьера необходимо определить альбуминовый уровень (Qальб) и вычислить предельное значение у пациентов с повышенным уровнем IgG (Qобщ.< Qпред.).

Оценить общий уровень IgG (Qобщ.).

8.1. Подготовка образцов.

8.1.1. В тесте могут использоваться парные образцы - сыворотка крови + спинномозговая жидкость.

8.1.2. Предварительная обработка образцов т.е. инактивация, необязательна, однако образцы не должны быть контаминированы микроорганизмами и не должны содержать красные кровяные тельца.

8.1.3. Сыворотка крови.

В добавление к разведению 1:200 для определения серостатуса, сыворотка разводится 1:1500 буфером для разведения.

Для расчета A1, разведение должно быть выбрано так, чтобы значения концентраций в международных единицах (МЕ) укладывались в диапазон анализа (см.6А и 8.2).

Если же значения обоих разведений выше диапазона исследования 100 МЕ, образцы необходимо еще раз развести.

8.1.4. Спинномозговая жидкость.

Образцы ЦСЖ доводятся до стандартного разведения 1:7 разбавителем образцов. Если измеренная концентрация антител выходит за рамки измеряемого диапазона, образцы необходимо еще раз разбавить, или повторно протестировать в меньшем разведении (max.1:2).

Сыворотка и спинномозговая жидкость всегда должны исследоваться параллельно в одном тесте (это также относится к повторным тестам) !

8.2. Процедура теста.

Далее, по ходу теста определение Rubella-IgG антител в паре сыворотка-спинномозговая жидкость проводится как описано в пункте 5А.

8.3. Определение общего IgG и альбуминовой концентрации.

В дополнение к определению Rubella-специфичных IgG антител в каждой паре образцов необходимо определить концентрацию общих IgG антител и альбуминовую концентрацию в сыворотке и спинномозговой жидкости.

8.4. Расчет результатов и валидности.

Валидность.

Определение критериев валидности (см.6А).

Повторить работу, если результаты не соответствуют спецификации.

Ниже следующие пункты также применимы к исследованиям СМЖ:

- Диапазон теста для СМЖ и сыворотки, разведенной 1:1500 находится от 2-100 МЕ.
- Сыворотка с содержанием антител <5 МЕ расценивается как серонегативная. В подобных случаях индекс антител не может быть определен.
- В редких случаях пациенты с серонегативным индексом могут иметь очевидные интраккальные антитела вследствие Rubella-ассоциированной энцефалопатии.
- Сыворотки, со значениями превышающими диапазон теста, должна быть в дальнейшем разведена таким образом, чтобы значение(МЕ) могло определяться в пределах диапазона исследования.
- Образцы спинномозговой жидкости, со значениями превышающими диапазон теста должны быть в дальнейшем разведены таким образом, чтобы значение(МЕ) могло быть рассчитано в соответствии с тестовыми параметрами.
- Образцы СМЖ от пациентов с позитивным серостатусом, значение которых в разведении 1:7 находятся ниже диапазона теста, должны быть протестированы снова в меньшем разведении (max 1:2).

Оценка.

- расчет значений в международных единицах (МЕ) (см.6А).
- расчет патоген - специфичного IgG (Qспец.):

Qспец.= МЕ значение СМЖ x разведение СМЖ / МЕ значение сыворотки x разведение сыворотки.

Подсчет индекса антител.

Расчет патоген-специфичного индекса производится по следующим формулам:

1. A1 = Qспец./ Qобщ. (для Qобщ. < Qпред.)

2. A1 = Qспец./ Qобщ. (для Qобщ. > Qпред.)

3. Qпред. = 0.93 x√(Qальб.²) + 6x10-6 -1.7x10-3

8.5.Интерпретация результатов.

Значения от 0,6 до 1,3 относятся к нормальным значениям

Значения > 1.3 и ≤ 1.5 относятся к сомнительным

Значения > 1.5 относятся к патологическим

Значения < 1.6 считаются ошибочными и не интерпретируются