

Інструкція з використання

Вірус денге Igg ІФА

Каталожний No. E-DIG-K22



IVD CE



2^o 8^o

RD-RatioDiagnostics	Phone: + 49 (0) 69 / 7807 4942
Westerbachstraße 47	Fax: + 49 (0) 69 / 7807 4998
60489 Frankfurt	Email: info@rd-labs.com
Німеччина	www.RD-LABS.com

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18,

info@novamedline.com, www.novamedline.com

ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Тестова система RD-RatioDiagnostics E-DIG-K22 денге IgG ІФА - це набір імуноферментного аналізу, що забезпечує матеріал для виявлення антитіл класу IgG до антигену вірусу Денге в сироватці або плазмі людини. Цей аналіз призначений лише для використання in vitro.

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ТА ПОЯСНЕННЯ

Вірус денге, що передається комарами (серотип 1-4), викликає лихоманку денге, важкий грип, як хвороба. Хвороба поширена в тропічних регіонах і поширюється на субтропічні країни. За оцінками ВОЗ, щороку у всьому світі трапляється 50-80 мільйонів випадків лихоманки денге, включаючи потенційно смертельну форму захворювання, яка називається геморагічним та синдромом шоку денге. Первинне зараження вірусом денге призводить до самолімітуючого захворювання, яке характеризується легкою та високою температурою, що триває 3-7 днів.

ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір IgM E-DIG-K22 Денге заснований на техніці ІФА. Під час аналізу контролю та невідомі інкубують у мікротитрувальних лунках, покритих рекомбінантним N51 антигеном вірусу Денге. Після інкубації та промивання лунки обробляють кон'югатом, що складається з анти IgG людини антитіл, мічених пероксидазою. Після другої стадії інкубації та промивання лунки інкубують із субстратом тетраметилбензидину (ТМБ). Потім додають кислий стоп розчин і визначають ступінь ферментативного

обороту субстрату шляхом вимірювання довжини хвилі поглинання при 450 нм. Виміряне поглинання прямо пропорційне концентрації антитіл IgM до вірусу Денге.

РЕАГЕНТИ

Набір RD-RatioDiagnostics Денге IgG ІФА містить достатньо реагенту для 96 лунок. Кожен набір містить такі реагенти :

Матеріали надані	кількість	Каталожний номер
Мікропланшет, покритий антигеном вірус Денге	Один планшет	E-DIG-10
Промивний концентрат	Одна пляшка	E-WSL-30
Розчинник зразка	Одна пляшка	E-DLB-40
ТМБ субстрат	Одна пляшка	E-TMB-08
Негативний контроль	Один флакон	E-DIG-01
Пороговий контроль	Один флакон	E-DIG-02
Позитивний контроль	Один флакон	E-DIG-03
Вторинне антитіло кон'югат	Одна пляшка	E-DIG-20
Стоп розчин	Одна пляшка	E-STP-09

МАТЕРІАЛИ НЕ НАДАНІ

- Рідер мікропланшетів для вимірювання поглинання при 450 нм
- Дейонізована / дистильована вода
- Точна піпетка для подачі 10 мкл 100 мкл і 1 мл
- Напівавтоматична піпетка для подачі 100 мкл
- Автоматичний вошер для мікропланшетів
- Абсорбуючий матеріал для промокання стріпів
- Інкубатор

НАДАНІ РЕАГЕНТИ

Стріпи мікропланшета з антигенним покриттям Денге:

Один тримач стріпів, що містить 12x8 (96) лунок мікропланшета, покритих очищеним антигеном 4 серотипів вірусу денге. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності. Вийміть тримач та стріпи, які будуть використовуватися, з упаковки з фольги та покладіть невикористані стріпи в поліетиленовий пакет з силікагелем, видаліть повітря та ущільніть, натиснувши на кришку. Після відкриття продукт стабільний протягом 4 тижнів при температурі 2-8 ° С.

Концентрат для промивання:

Одна пляшка, 100 мл, що містить сольовий розчин, забуферений фосфатом, концентрований 10-кратний, що містить 0,5 об.% Бридж за об'ємом (мас. / Об.). Перед використанням розбавити дейонізованою / дистильованою водою. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

Розчинник зразка:

Одна пляшка, 100 мл, що містить розчин білка з 0,09% азидом натрію в якості консерванту. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

Контролі Денге IgG:

Три флакони, негативні, порогові та позитивні, по 2 мл людської сироватки в 0,01 М фосфатному буфері з 0,09% азидом натрію в якості консерванту. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

Вторинне антитіло кон'югат :

Одна пляшка, 12 мл, що містить моноклональні антитіла IgG проти людини, мічені пероксидазою, у розчині фосфатного буфера з 0,02% прокліну. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

ТМБ - субстрат:

Одна пляшка, 12 мл, що містить тетраметилбензидин (ТМБ) і перекис водню, стабілізовані в цитратному буфері, рН 3,8. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

Стоп - розчин:

Одна пляшка, 15 мл, що містить 0,3 М H₂SO₄ у розчині. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

Для використання in vitro Слід дотримуватися таких універсальних належних лабораторних практик: не їжте, не пийте, не паліть і не застосовуйте косметику там, де обробляють імунодіагностичний матеріал. Не піпетувати через рот. Надягайте лабораторні халати та одноразові рукавички під час роботи з імунодіагностичним матеріалом. Після цього ретельно вимийте руки. Закрийте робочу зону одноразовим абсорбуючим папером. негайно витріть розлиті плями та знезаразити уражені поверхні. Уникайте утворення аерозолів. Забезпечити достатню вентиляцію. Обробляйте та утилізуйте всі реагенти та матеріали відповідно до чинних норм.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: ПОТЕНЦІАЛЬНИЙ БІОЛОГІЧНО НЕБЕЗПЕЧНИЙ МАТЕРІАЛ

Цей набір може містити деякі реагенти, виготовлені з вихідним матеріалом людини (наприклад, сироваткою або плазмою) або використані разом із вихідним матеріалом людини. Матеріал у цьому наборі був протестований методами, рекомендованими CE, і виявлено, що він не реагує на антитіла до ВІЛ-1/2, HCV та HBsAg. Жоден доступний метод випробувань не може дати повних гарантій усунення потенційного ризику для біологічної безпеки. Обробляйте всі реагенти та зразки пацієнтів на рівні Біобезпеки 2, як рекомендується для будь-якого потенційно інфекційного людського матеріалу в Посібнику Центрів контролю захворювань / Національний інститут охорони здоров'я "Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях", 4-е видання, квітень 1999 року.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ:

Деякі реагенти цього набору містять азид натрію як консервант у концентраціях нижче нормативної межі <0,1%. Концентрований азид натрію, хоча і значно розбавлений, подразнює шкіру та слизові оболонки і може реагувати зі свинцевим та мідним водопроводом, утворюючи вибухонебезпечні азиди металів, особливо якщо накопичуються. Крім того, ТМБ та сірчана кислота у концентрованих кількостях також подразнюють шкіру та слизові оболонки. Ці речовини знаходяться у розведеному вигляді, і тому можуть значно мінімізувати ризики впливу, але не повністю. Забезпечити достатню вентиляцію. Уникайте контакту зі шкірою, очима та одягом.

У разі контакту з будь-яким із цих реагентів ретельно промити водою та звернутися до лікаря. Утилізуйте всі небезпечні реагенти, промиваючи великими обсягами води, щоб запобігти накопиченню хімічної небезпеки в сантехнічній системі. Для отримання додаткової інформації щодо небезпечних речовин у наборі, будь-ласка, зверніться до специфічних паспортів безпеки (DSDS) за запитом.

ЗБІР ЗРАЗКІВ І ОБРОБКА

Слід використовувати сироватку та дотримуватися звичайних запобіжних заходів щодо проколювання вени. Зразки можна зберігати при 2-8 ° С протягом 2 днів. Триваліше зберігати при –20 ° С. Не використовуйте гемолізовані або ліпемічні зразки. Уникайте повторного заморожування та розморожування зразків.

ПІДГОТОВКА ДО АНАЛІЗУ

Для успішного використання продукту необхідне глибоке розуміння цієї інструкції. Надійні результати будуть отримані лише за допомогою точних лабораторних методів та точно слідуючи інструкції, вкладеній в упаковку набору. Перед використанням доведіть усі реактиви та зразки до кімнатної температури (~ 25 ° С). Ретельно перемішайте реактиви та зразки перед використанням обережною інверсією. Не змішуйте різні партії будь-яких компонентів набору в рамках окремого аналізу. Не використовуйте жодних компонентів після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці. Неповне миття негативно вплине на результат та точність аналізу. Щоб мінімізувати можливий дрейф аналізу через зміну часу інкубації субстрату, слід подбати про додавання стоп розчину в лунки в тому ж порядку та за швидкістю для додавання хромогенного розчину ТМБ. Уникайте мікробного забруднення реактивів, особливо кон'югату, промивного буфера та розріджувача. Уникайте забруднення розчину хромогену ТМБ кон'югатом. Для кожного реактиву використовуйте чистий одноразовий наконечник піпетки. Уникайте піпеток з металевими деталями. Їмності та напівавтоматичні наконечники для піпеток, що використовуються для кон'югату та ТМБ, можуть бути використані повторно за умови, що вони ретельно промиті дейонізованою / дистильованою водою та висушені до та після кожного використання. Фермент, що використовується як мітка, інактивується киснем і дуже чутливий до мікробного забруднення, азиду натрію, хлористоводневої кислоти та ароматичних хлорвуглеводнів, які часто містяться в лабораторних запасах води. Використовуйте високоякісну воду. Уникайте впливу реактивів надмірним теплом або сонячним світлом під час зберігання та інкубації.

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ:

Промивний розчин:

Перед використанням розбавте 1:10 дейонізованою / дистильованою водою. Якщо присутні кристали, їх слід розчинити при температурі 37 ° С перед розведенням. Налийте 100 мл промивного концентрату в чисту ємність і розведіть, додавши 900 мл дейонізованої / дистильованої води. Ретельно перемішайте шляхом інверсії. Промивний розчин стабільний протягом 5 днів при кімнатній температурі та 2 тижні при 2-8 ° С при зберіганні в щільно закупореній пляшці.

Стріпи мікропланшету:

Виберіть кількість стріпів з покриттям, необхідних для аналізу. Залишилися невикористані лунки слід помістити в пакет, що закривається, з пакетом осушувача. Пакет потрібно закрити повторно, щоб захистити від вологи.

Процедура аналізу:

Усі зразки та реактиви повинні досягати кімнатної температури (~25 ° С) перед використанням. Зразки сироватки та контролю слід аналізувати у двох примірниках.

1. Позначте стріпи мікропланшетів, які слід використовувати.
2. Розведіть зразки сироватки 1: 101, розподіливши 10 мкл сироватки в 1 мл розчинника для зразків.
3. Піпетуйте по 100 мкл кожного розведеного зразка сироватки та готових до використання контролів у відповідні лунки. Додайте 30 μ L сорбенту М тільки в лунки розведених зразків.
4. Інкубуйте протягом 45 хвилин при 37 ° С.
5. Аспіруйте та промивайте кожну лунку чотири (4) рази протягом 30 секунд промивним розчином за допомогою автоматичного вошера для мікропланшетів або вручну за допомогою дозатора. Протріть і висушіть, перевернувши пластину на абсорбуючий матеріал.

ПРИМІТКА: Настійно рекомендується використовувати автоматичний вошер для мікропланшетів. Неповне миття негативно вплине на точність аналізу. Якщо вошера мікропланшетів немає, (а) повністю відсмоктуйте рідину з кожної лунки, (б) додавайте 0,35 мл промивного розчину в кожну лунку та (с) повторіть етапи (а) та (б) чотири рази.

6. Додайте 100 мкл ферментно міченого вторинного антитіла в кожну лунку.

7. Інкубуйте протягом 45 хвилин при 37 ° С.

8. Аспіруйте і промивайте кожну лунку чотири рази протягом 30 секунд промивним розчином за допомогою автоматичного вошера для мікропланшетів або вручну за допомогою дозатора. Протріть і висушіть, перевернувши планшет на абсорбуючий матеріал.

9. Додайте 100 мкл розчину хромогену ТМБ у кожну лунку за допомогою дозатора.

10. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі. Уникайте потрапляння прямих сонячних променів.

11. Додайте 100 мкл стоп розчину в кожну лунку за допомогою дозатора.

12. Прочитайте поглинання розчину в лунках протягом 30 хвилин, використовуючи рідер мікропланшетів, встановлений на 450 нм. Якщо доступна корекція довжини хвилі, встановіть прилад на подвійне вимірювання довжини хвилі на 450 нм з фоновою корекцією довжини хвилі на 600 або 620 нм.

РЕЗУЛЬТАТИ

Обчисліть середню абсорбцію для кожного контролю та невідомого.

Якісні результати:

Якщо поглинання зразка вище, ніж поглинання порогового контролю, зразок позитивний на наявність специфічного IgG. Обчисліть співвідношення між середнім значенням ОГ для зразка та значенням порогового значення. Зразок розглядається:

Позитивний: якщо коефіцієнт > 1,1.

Сумнівний: якщо +/- 10% від порогового значення.

Негативний: якщо коефіцієнт < 0,9.

Якщо результат сумнівний, повторіть тест. Якщо це залишається сумнівним, візьміть новий зразок сироватки.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Зразок сироватки, отриманий на ранній фазі зараження, коли присутні лише антитіла IgG, може бути негативним за цією процедурою.
- Результати тесту слід використовувати разом з інформацією, отриманою в результаті оцінки інших клінічних та діагностичних процедур.
- Уникайте повторного заморожування та розморожування реагентів та зразків.
- Слід уникати грубо гемолізованих, жовтяничних або ліпемічних зразків.
- Слід уникати нагрівання інактивованих сироваток.
- Серологічні дані пацієнтів із ослабленим імунітетом та новонароджених дітей мають обмежене значення

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Значення ОГ для порогового контролю повинні бути не менше 0,2. Позитивний контроль повинен мати ОГ як мінімум у 1,5 рази більше, ніж пороговий показник.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ**1. Чутливість та специфічність**

66 сироватки людини аналізували за допомогою цього набору вірус Денге IgM ІФА та комерційного препарату ІФА (тест А) як еталонний метод. З 66 зразків 4 виявили позитивні результати на наявність антитіл IgM до вірусу Денге за даними RD-RatioDiagnostics (RD-labs) ІФА та комерційного ІФА показали 4 з них як позитивні. Результати зведені нижче

	позитивний	негативний	ЛН (ложно-негативний)	ЛП (ложно-позитивний)
RD-labs	4	62	0	0
Тест А	4	62	0	0

22. Точність

Дослідження в аналізі				
Кількість повторень	Сироватка 1	Сироватка 2	Сироватка 3	
16	0.206	0.063	1.064	
середнє	0.003	0.004	0.008	
СВ	1.8	7.87	0.84	
CV%				
Дослідження між аналізами				
Кількість повторень	Сироватка 1	Сироватка 2	Сироватка 3	
16	0.051	0.974	1.2	
середнє	0.006	0.078	0.057	
СВ	12.64	8	4.7	
CV%				

3. Дослідження впливу

Втручання з ліпемічними, гемолітичними або жовтяничними сироватками не спостерігається до концентрації 5 мг / мл гемоглобіну, 5 мг / мл тригліцеридів та 0,2 мг / мл білірубину

ЛІТЕРАТУРА

1. Pinherio FP, Cobber SJ: Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas, Worl Health Stat Q 50(3/4):161-169,1997