

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ IgG АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ХЕМА ЛЕЙКОЗ IgG-ИФА

Только для ин витро исследований

Номер по каталогу: K107B.2

Производитель: ООО «ХЕМА»

Электронная почта: info@xema.ru; интернет: www.xema-medica.com

Версия набора: 1905

Ю.С. Лебедин

**КОПИЯ
ВЕРНА**



Введение

Лейкоз - это хроническая инфекционная, медленно протекающая болезнь опухолевой природы. Болезнь сопровождается поражением органов кроветворной системы, появлением повышенного количества лимфоцитов в крови, иногда опухолеобразным поражением органов и тканей организма.

Принцип определения

Определение IgG антител к антигенам возбудителя лейкоза крупного рогатого скота основано на непрямом варианте иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизован антиген. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к IgG КРС с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию специфических IgG антител к антигену.

Исследуемый материал

Набор предназначен для выявления IgG антител к возбудителю лейкоза крупного рогатого скота (КРС) в сыворотке крови КРС, молоке цельном, молоке пастеризованном.

Состав набора:

Код	Наименование	Кол-во	Ед-цы	Цвет
1 P107B	Планшет полистироловый, разделяемый по лункам	2	шт	-
2 CN107BZ CP107BZ	Контрольные сыворотки (отрицательный и положительный контроли), готовы к использованию, 3 мл	2	шт	бесцветный, красный
3 T107BZ	Конъюгат, готов к использованию, 28 мл	1	шт	красный
4 S011Z	Буфер для разведения образцов, 100 мл	1	шт	синий
5 S008Z	Концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26x-кратный, 50 мл	1	шт	бесцветный
6 R055Z	Раствор субстрата - 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), 28 мл	1	шт	бесцветный
7 R050Z	Стоп-реагент, 28 мл	1	шт	бесцветный
8 N003	Пленка для заклеивания планшетов	4	шт	-
9 K107B.2IR	Инструкция «ХЕМА Лейкоз IgG-ИФА»	1	шт	-

Важные замечания по хранению реагентов и выполнению теста

- Не смешивайте и не используйте в одной постановке реагенты разных серий.
- Набор рассчитан на проведение анализа в монопликатах 184 исследуемых образцов и 2 проб контрольных сывороток (всего 192 определения).
- Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму), молоко следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов не допускается.
- После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона или пробирки. ВНИМАНИЕ: закрывайте каждый флакон СВОЕЙ крышкой.
- Все компоненты набора должны храниться в холодильнике (+2...+8 °С). Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.
- В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:
 - оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
 - конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
 - контрольные сыворотки после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности набора;
 - оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора. Приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.
- Не используйте для отмывки микропланшет растворы, содержащие азид натрия. Азид натрия даже в следовых количествах ингибирует маркерный фермент - пероксидазу, что может привести к заниженному сигналу.
- Внимание: во время всех инкубаций заклеивайте планшет клейкой лентой. Не допускайте пересыхания лунок микропланшет между стадиями постановки.
- Отмывка микропланшетов может проводиться как вручную, так и с использованием автоматических устройств. Вносите не менее 250 мкл Отмывочного буфера в лунку при каждой отмывке. Задержка при отмывке («замачивание») не требуется. После окончания ручной отмывки резко опрокиньте микропланшет на фильтровальную бумагу для удаления остатков буфера.
- После остановки реакции с субстратом измеряйте оптическую плотность в течение не более 15 минут.
- Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

Оборудование

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру +37 °С ±2 °С;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 10–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

Подготовка реагентов для анализа

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшетов.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

Постановка реакции:

1	Разведите исследуемые образцы в 41 раз Буфером для разведения образцов S011Z. Пример разведения: 400 мкл Буфера для разведения образца и 10 мкл образца. НЕ РАЗВОДИТЕ образцы молока и контрольные сыворотки.
2	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в монопликатах и 4 лунки для контрольных сывороток (Отрицательный контроль 3 лунки, Положительный контроль 1 лунка).
3	Внесите в лунки по 100 мкл положительного и отрицательного контролей и исследуемых образцов (разведенные образцы сыворотки (плазмы) или цельное молоко без разведения). Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета.
4	Инкубируйте 60 минут при температуре +37 °С.
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза . При каждой отмывке добавляйте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора, встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
6	Внесите в лунки по 100 мкл Конъюгата .
7	Инкубируйте 60 минут при температуре +37 °С.
8	Отмойте стрипы 5 раз Отмывочным раствором.
9	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
10	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
11	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.
12	Рассчитайте содержание IgG антител к антигенам вируса лейкоза КРС в исследуемых образцах. Для этого: 1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля: $ОП (CN107BZ)_{Ср} = (ОП1 (CN107BZ) + ОП2 (CN107BZ) + ОП3 (CN107BZ)) / 3;$ Результаты анализа считать достоверными, если - ОП Положительного контроля не ниже 0.4 оптических единиц (ОЕ) - ОП Отрицательного контроля не выше 0.15 ОЕ во всех лунках 2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.3 $Cut\ off = ОП (CN107BZ)_{Ср} + 0.3$ 3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off $ИП = ОП_{образца} / Cut\ off$

Интерпретация результатов:

Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Интерпретация результатов:

При ИП > 1.1 образец положительный,

при ИП < 0.9 – отрицательный.

При значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результат в пограничной зоне (+/-).

Такие сыворотки рекомендуется исследовать повторно. Если повторный полученный результат будет неопределенным, то следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными.