

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ IgG ДО ІНФЕКЦІЇ ORIENTIA TSUTSUGAMUSHI

### 8406-25, Scrub Typhus IgG

Каталог. №: 8406-25

Методика від 11-10-2013

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадат.

#### Для застосування тільки в дослідницьких цілях

Аналіз	Scrub Typhus IgG ELISA
Метод	Твердофазний імуоферментний аналіз
Принцип	Мембранний імуоаналіз
Діапазон визначення	Якісний: позитивний та негативний контроль
Зразок	50 мкл
Час виконання	~110 хв.
Термін придатності	12 міс.
Специфічність	Не визначена
Чутливість	Не визначена

\*Лабораторні результати ніколи не можуть служити єдиною підставою для медичного висновку. Історія пацієнта та подальші дослідження повинні бути прийняті до уваги.

#### ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір ІФА для виявлення антитіл класу IgG в сироватці/плазмі людини до тифу *Orientia tsutsugamushi* (OT; колишня *Rickettsia*) із отриманого рекомбінантного антигену (1-10). Це дослідження призначене щоб допомогти в діагностиці впливу на людину видів OT. Він не призначене для скринінгу крові або її компонентів. Для застосування тільки в дослідницьких цілях.

#### ОПИС І ПОЯСНЕННЯ АНАЛІЗУ

(Див. в оригіналі інструкції).

#### ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Даний набір є якісним ІФА для виявлення антитіл класу IgG до *Orientia tsutsugamushi* (OT) у сироватці/плазмі крові. лунки кожного планшету були покриті спеціальною сумішшю рекомбінантних антигенів. Під час дослідження зразки сироватки розводять розділювачем зразка виробника та вносяться в кожну лунку. Див. нижче "Приклад застосування сироваток". Після інкубації і промивання лунки обробляються поліклональними антитілами кози до людських IgG антитіл, мічених ферментом пероксидазо хрому. Після другої інкубації і стадії промивання лунки інкубують із субстратом тетраметилбензидином (ТМБ). Потім додають кислий стоп-розчин і ступінь ферментативної реакції визначається вимірювання оптичної щільності при 450 нм. Виміряне поглинання безпосередньо пропорційне концентрації IgG антитіл до наявного тифу OT. Набір позитивних і негативних контролів постачаються в якості внутрішніх контролів. Вони призначені для контролю цілісності компонентів набору.

#### МАТЕРІАЛИ

Даний набір містить достатньо реагентів для 96 лунок. Кожен набір включає наступні реагенти:

##### 1. Планшет ІФА для визначення тифу OT:

Один тримач смужки у фользі ziplock, що містять 96 мікротитрувальних лунок із полістиролу, кожна з яких покрита рекомбінантними антигенами від OT. Стабільний при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

##### 2. Буфер для розведення зразків:

Дві пляшки, 25 мл кожна, які будуть використовуватися для підготовки розведень зразка. Може утворюватися невеликий осад. Акуратно змішати перед використанням. Стабільний при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

##### 3. Позитивний контроль для визначення тифу OT:

Один флакон, 30 мкл. Позитивний контроль також сприятиме контролю цілісності набору. Стабільний при 2 ° С - 8 ° С до закінчення терміну придатності. Перед використанням швидко центрифугувати флакон, так щоб вміст був зібраний на дні.

##### 4. Негативний контроль для визначення тифу OT:

Один флакон, 50 мкл. Негативний контроль сприятиме контролю цілісності набору. Стабільний від -20 ° С до -70 ° С до закінчення терміну придатності. Перед використанням швидко центрифугувати флакон так, щоб вміст був зібраний на дні.

##### 5. Готовий до застосування ферментний кон'югат пероксидази хрому (HRP):

Одна пляшка, 12 мл попередньо розведеного кон'югату, який буде використовуватися як у наведеній нижче процедурі. Стабільний при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

**Примітка:** Субстрат повинен весь час зберігатися в захищеному від світла ємкості.

##### 6. 10X промивний буфер:

Одна пляшка, 120 мл 10x концентрату промивного буфера для розбавлення і використовується у всіх кроках цієї процедури. Стабільний при температурі 2-8°C до закінчення терміну придатності.

**Примітка:** Див. Підготовка реагентів у розділі Процедура дослідження щоб приготувати 1x промивного буфера.

##### 7. Розчин для промивання:

Одна пляшка, 20 мл розчину для промивання для використання в на етапах промивання після додавання ферментного кон'югату (HRP) і перед додаванням рідкого ТМБ в цій процедурі. Стабільний при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

##### 8. Рідкий субстрат ТМБ:

Один флакон, 12 мл рідкого субстрату, який буде використовуватися в цій процедурі. Стабільний при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

**Примітка:** Субстрат повинен весь час зберігатися в захищеному від світла місці.

##### 9. Стоп - розчин:

Один флакон, 6 мл використовується для зупинки реакції. Стабільний при температурі 2-8°C до закінчення терміну придатності.

**Увага:** сильна кислота, надівати захисні рукавички, лабораторний халат і захисні окуляри. Утилізувати всі матеріали відповідно до правил і норм безпеки.

**Примітка:** Всі реагенти та контролі перед використанням повинні бути доведені до кімнатної температури (20 ° С ~ 25 ° С ) і змішані акуратним перевертанням.

#### Необхідні матеріали, що не поставляються

1. Планшетний фотометр, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм.
2. Біологічну або вода високої очистки.
3. 37 ° С зволожуючий інкубатор без подачі CO<sub>2</sub>.  
**Примітка:** Зволоження може бути досягнуто з використанням водяного лотка в нижній частині інкубатора.
4. Промивач планшетів.
5. Багатоканальні дозатори.
6. Таймер.

#### ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

1. Тільки для використання в дослідницьких цілях. Не для використання в діагностичних процедурах.
2. Всі людські матеріали, використані при підготовці контролів під час перевірки виявились негативними на антитіла до ВІЛ-1 і 2, гепатиту С і поверхневого антигену гепатиту В. Проте, жодне дослідження не може гарантувати 100 % ефективності. Таким чином, всі людські контролі та антигени слід розглядати як потенційно інфіковані матеріали. Центр контролю за захворюваннями та Національний інститут охорони здоров'я рекомендують поводитися з потенційно інфекційними носіями за рівнем біобезпеки 2.
3. Глибоке розуміння цієї інструкції необхідне для успішного використання виробу. Достовірні результати тільки будуть отримані з використанням точних лабораторних методів і чітким дотриманням інструкції користувача.
4. Не змішуйте компоненти наборів з різних партій в одному дослідженні.
5. Не використовуйте будь-який компонент після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
6. Уникайте впливу реагентів від надмірного нагрівання і впливу прямих сонячних променів під час зберігання та інкубації.
7. Деякі реагенти можуть утворювати незначні осадки, які слід акуратно перемішувати перед використанням.
8. Неповне промивання негативно позначиться на результатах аналізу і точності.

- Щоб звести до мінімуму збою в аналізі через зміну часу інкубації субстрату, слід подбати про додавання стоп-розчину в лунки в одному порядку з однаковою швидкістю додавання розчину ТМБ.
- Уникайте мікробної контамінації реагентів, особливо в готовому до застосування ферментного кон'югату-HRP для аналізу NS1. Уникайте забруднення розчину субстрату ТМБ кон'югатом-HRP.
- Носіть захисний одяг, засоби захисту очей і одноразові рукавички під час проведення аналізу. В кінці руки слід ретельно помити.
- Використовуйте чисті одноразові наконечники для кожного реагенту, стандарту, контролю або зразка.
- Накрийте робочу зону одноразовим промокальним папером.

#### ПОПЕРЕДЖЕННЯ: потенційно біологічно небезпечний матеріал

Цей набір може містити реагенти виготовлені з людської сироватки або плазми. Сироватка або плазма була інактивована теплом, якщо не вказано інше. Поводитися з усіма сироватками й наборами як такими, що містять носії інфекції. Дотримуйтесь встановлених застережень щодо мікробіологічного ризику при виконанні всіх процедур і дотримуйтесь стандартних заходів по утилізації зразків.

#### ХІМІЧНА НЕБЕЗПЕКА

Паспорти безпеки матеріалів (MSDS) доступні для всіх компонентів цього набору. Перегляньте всі відповідні MSDS до проведення цього аналізу. Уникайте контакту з руками і очима або слизовими оболонками під час дослідження. Якщо контакт все ж відбувається, зверніться до MSDS відносно усунення наслідків.

#### Забір і підготовка зразків

- Сироватка людини повинна бути використана в цьому дослідженні. Цільна кров або плазма не може бути досліджена безпосередньо.
- Відділити сироватку від згустків червоних клітин яконайскоріше, щоб уникнути гемолізу.
- Дослідження слід проводити якомога швидше після збору. Не залишайте сироватку при кімнатній температурі протягом тривалого періоду часу.
- Слід використовувати сироватку і дотримуватись стандартних запобіжних заходів при венепункції. Зразки можна зберігати при температурі 2-8 °C протягом 48 годин або заморожувати при -20 °C або нижче до 30 днів. Для підтримки збереженості сироватки зберігати при -70 °C. Уникати повторного заморожування і відтавання зразків.
- Заморожені зразки слід розморозити при кімнатній температурі і ретельно перемішати обережно покручуючи або перевертаючи перед використанням. Завжди швидко покрутіть перед використанням.
- Якщо сироватки транспортуються, їх слід упакувати у відповідності з правилами, що стосуються перевезення носіїв інфекцій.
- Не використовувати якщо присутні будь-які ознаки розмноження.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Довести всі реагенти до кімнатної температури (~ 25 °C) і ретельно перемішати, обережно перевертаючи перед використанням.

#### Підготовка реагентів:

- 1x промивний буфер

Розвести 10X промивного буфера 1X біологічної або високоочищеної води (змішати 120мл 10X промивного буфера з 1080мл води). Після розведення до 1x зберігати при кімнатній температурі протягом максимум чотирьох місяців.

Зверніть увагу: Відмовитися від 1x промивного буфера якщо ви бачите будь-який мікробний ріст.

- Мікротитраційні лунки

Виберіть кількість лунок необхідних для проведення аналізу. Решту невикористаних лунок повинні бути поміщені назад в упаковку, герметичні закриті з осушувачем і зберігатись при температурі 2-8 °C до готовності для використання або до закінчення терміну придатності.

**Примітка:** при тривалому зберіганні всі сироватки не може бути повторно розморожені та заморожені. Сироватки мають бути далі аліквотовані в меншому об'ємі і зберігатись при -20 до -70 °C.

#### Процедура:

Довести всі реагенти до кімнатної температури (~ 25 °C) і ретельно перемішати, обережно перевертаючи перед використанням. Позитивний, негативний контролю і невідомі зразки слід аналізувати в дублях. Досліджувані зразки можуть аналізуватись в одному екземплярі.

- Визначити кількості сироватки для дослідження.
- Розташувати сироватки у відповідності до "Прикладу застосування сироваток", який наводиться нижче (тільки для скерування, ви можете створити свою власну схему). Ви можете провести розведення або в пробірках, або пластикових пробірках для ІФА (необроблений пластик; не постачається).

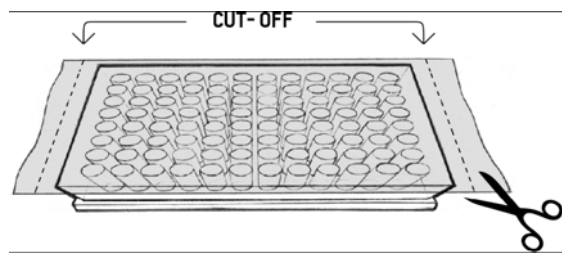
#### Приклад схеми розташування сироваток, розбавлені зразки 1/100, 100 мкл/лунку

(Див. в оригіналі інструкції).

- Розвести сироватки для аналізу 1/100, використовуючи наданий буфер розведення зразків для даного набору (можна використовувати пропорцію: 4 мкл сироватки + 396 мкл буферу для розведення зразка набору). Добре перемішати.

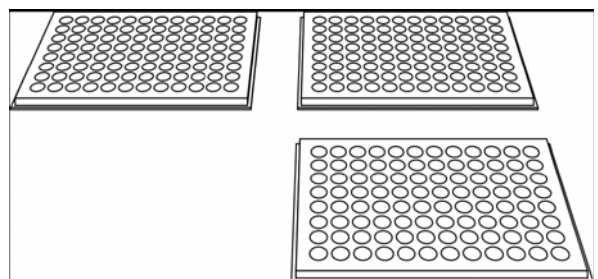
**Примітка:** Не використовуйте менше 4 мкл сироватки та контролю.

- Внести до планшету ІФА для визначення тифу по 100 мкл на лунку 1/100 розбавлених сироваток для дослідження та контролів.
- Накрити планшет парафільмом або спеціальною плівкою на рівні відкриття лунок. (Будь ласка, прочитайте важливу примітку нижче). Інкубувати при 37 ° C протягом 30 хвилин у зволоженому інкубаторі. Зволоження може бути досягнуто з використанням водяного лотка в нижній частині інкубатора.



**Примітка:** Це робиться для того, щоб температура рівномірно розподілялась в усіх лунках по дну і стінках; будь-які залишки парафільму повинні бути відрізані як тільки верх запечатаний, щоб запобігти випаровуванню.

**Примітка:** Не складати планшети один на одного. Вони повинні бути розміщені на одному рівні. Це дуже важливо для рівномірного розподілу температури. Не слід використовувати CO<sub>2</sub>, або будь-які інші гази, які використовуються для культивування тканини.



#### ПРАВИЛЬНИЙ СПОСІБ

- Після завершення інкубації промити смужки 6 ( шість ) разів 1X промивним буфером, використовуючи автоматичний планшет-вошер. Використовуйте 300 мкл на лунку 1X промивного буфера в кожному циклі промивання для всіх планшетів.
- Додати 100 мкл у всі лунку готового до використання ферментного кон'югату HRP для даного набору, використовуючи багатоканальний дозатор.
- Накрийте планшет парафільмом на рівні поверхні лунок. (Як описано в п. 5).

9. Інкубувати планшет при 37 °С протягом 30 хвилин в інкубаторі зі зволоженням.
10. Після інкубації промити планшет 6 разів з автоматичним планшет-вошером, використовуючи 1х промивний буфер, 300 мл на лунку.
11. Додати 150 мкл на лунку розчину для промивання в усі лунки за допомогою багатоканального дозатора.
12. Інкубувати планшет при кімнатній температурі (20-25 °С) протягом 5 хвилин без накривання планшету.
13. Після інкубації промити планшет 6 разів з автоматичним планшет-вошером, використовуючи 1х промивальний буфер, 300 мл на лунку.
14. Додати 100 мкл на лунку рідкого субстрату ТМБ в усі лунки за допомогою багатоканального дозатора.
15. Інкубуйте планшет при кімнатній температурі ( 20-25 °С) в темному місці (або контейнер) протягом 10 хвилин без накривання планшету.
16. Після інкубації додати 50 мкл на лунку стоп-розчину в усі лунки за допомогою багатоканального дозатора та інкубувати при кімнатній температурі ( 20-25 °С) протягом 1 хвилини без накривання планшету.  
**Примітка: Для отримання точних результатів слід проявляти обережність при внесенні стоп-розчину з тією ж швидкістю що й субстрату ТМБ.**
17. Після інкубації зчитати значення ОЩ при 450 нм за допомогою мікротитраційного планшет-рідера. Зауваження: Не віднімати будь-який фон.

## Результати

### Розрахунок порогового значення (cut-off):

Розрахунок порогового значення вимагає визначення середньої ОЩ плюс трьох визначень стандартного відхилення (СВ) нормальної людської сироватки та / або сироваток людини не пов'язаних з інфекціями.

Наступні порогові значення були розраховані з використанням обмеженого числа ендемічних контрольних сироваток з Індії.  
Порогове значення: 0,370

**Примітка:** Порогове значення не визначалось з використанням великої кількості населення. Таким чином, кінцевим користувачам рекомендовано визначати їх порогове значення, використовуючи географічно обумовлені зразки сироватки.

### Інтерпретація результатів:

1. Зразки зі спектрофотометричним зчитуванням > порогового значення вважаються «реактивними», а зразки нижче цього критерію вважаються "нереактивними".
2. Будь-який "реактивний" зразок повинен бути повторений для перевірки результату. Значення близькі до порогового вважаються сумнівними, а аналіз повинен бути повторений у трьох репліках і більше.

Фактор	Допустиме значення
Негативний контроль (НК)	< 0,200
Позитивний контроль (ПК)	> 0,500
Дозволена здатність (К <sub>плкнс</sub> )	≥ 5,0

### Обмеження

1. Може мати місце серологічна перехресна реактивність по всій групі мікобактерій.
2. Реагенти, що поставляються в цьому наборі оптимізовані для вимірювання рівня антитіл в сироватці/плазмі крові, реактивних до антигенів від ОТ.
3. Повторного заморожування і розморожування реагентів, що поставляються в наборі та зразків слід уникати. Не заморожувати рідкий субстрат ТМБ.
4. Гемолізовані та ліпемічні зразки можуть призвести до помилкових значень і не повинні використовуватися.
5. Характеристики виконання аналізу не були встановлені для візуального визначення результату .

### РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Порівняння сироватки та плазми: аналіз, описаний тут був оптимізований до сироватки. Слід бути обережним з якістю зразка. Домішки, ліпемічні та давні зразки не повинні використовуватися. Використання свіжих зразків є бажаним.

**Специфічність і чутливість:** специфічність і чутливість детально не були встановлені через обмежену кількість проведених досліджень.



## ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)