

НАБОР ИФА ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgA К BORDETELLA PERTUSSIS

EIA-3449, Bordetella pertussis/toxin IgA ELISA

Каталог. № : EIA-3449
Количество : 96
Производитель: DRG (США)

Методика от 07-2012
Версия 13.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1.1 ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментный анализ для качественного и полуколичественного определения антител IgA к Bordetella pertussis и к токсину Bordetella pertussis в сыворотке и плазме человека.

1.2 Общая информация

Бордетелла - это необразующие споры инкапсулированные биполярные грамм-отрицательные бактерии. Форма – кокки (около 0,3-0,5 мкм толщиной и 1 мкм длиной). Род представлен паразитами человека B. pertussis и B. parapertussis, а также B. bronchiseptica вызывающим энзоотические инфекции у различных домашних и диких животных.

Bordetella pertussis провоцирует у человека заболевание – коклюш. Это очень заразная детская болезнь (примерно 80% случаев наблюдаются у детей до 5 лет) которая передается респираторным путем и имеет высокий уровень смертности (примерно 1-2% в первый год жизни и позже около 1%).

При отсутствии иммунизации никто не может избежать коклюша. К коклюшу вырабатывается иммунитет, который долгосрочный, но непостоянный. Заболевание распространено по всему миру, хотя на распространение влияют иммунизация, социальный уровень населения, экономические факторы и качество питания. В большинстве стран рекомендована активная вакцинация. Обычно иммунизация против коклюша сочетается с прививками против дифтерии и столбняка.

2 Принцип анализа

DRG Bordetella IgA ELISA - это набор для определения антител класса IgA к Bordetella pertussis и к её токсину в сыворотке человека. Микротитровальные стрипованные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигенами Bordetella pertussis/toxin и филаментным гемагглютинином. Разведенные образцы пациента и готовые к использованию контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфичные к Бордетелле антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляется конъюгат антител IgA человека с меткой пероксидазы хрена. Во время второй инкубации этот конъюгат связывается специфически с антителами IgA, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями.

После второй промывки (для удаления несвязанного конъюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое во время остановки реакции посредством добавления серной кислоты. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgA, специфичных к Бордетелле. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA - ридере.

3 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для in vitro диагностики и профессионального использования.
- Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно. Используйте действительную версию инструкции, приложенную к набору. Убедитесь, что вам все понятно.
- Все реагенты этого набора, которые содержат сыворотку или плазму человека, были протестированы и показали отрицательный результат на HIV I/II, HBsAg and HCV по методам одобренным FDA. Однако, не существует методов, гарантирующих полное отсутствие этих веществ. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально опасными.
- Избегайте контакта со стоп раствором – 0.2M H₂SO₄. Это может вызвать раздражения кожи или ожоги.
- Раствор субстрата ТМБ оказывает раздражающий эффект на кожу и слизистые. В случае контакта, промойте глаза с большим объемом воды и кожу с мылом и большим количеством воды. Промойте загрязненные объекты перед повторным использованием. В случае вдыхания реагентов, выведите человека на свежий воздух.
- Микротитровальная плашка содержит делимые стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2 °C - 8 °C в пакете из фольги и использоваться с поставляемой рамкой.
- Пипетирование образцов и реагентов должно осуществляться как можно быстрее и с одинаковыми временными интервалами.
- Используйте резервуары только для одного компонента. Это особенно важно для резервуаров с субстратом. Использование для разлива субстрата емкости, которая прежде использовалась для раствора конъюгата, может привести к изменению цвета раствора. Не сливайте реагенты обратно в флаконы, так как это может привести к контаминации реагентов.
- Для получения достоверных результатов тщательно перемешивайте содержимое лунок. Не используйте лунки повторно.
- Не позволяйте лункам высохнуть во время анализа; добавьте реагенты сразу после промывки.
- Перед анализом доведите все компоненты до комнатной температуры (21-26 °C) - температура влияет на показания абсорбции. Тем не менее, не будет влияния на образцы пациентов.
- Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
- Нельзя есть, пить, курить или наносить косметику в месте работы с реагентами.
- Надевайте одноразовые перчатки при раскапывании образцов и реагентов.
- Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с процедурами, утвержденными соответствующим управлением биологической безопасности и регулирования.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Все указанные объемы должны соблюдаться в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты возможны только при использовании калибровочных пипеток и микропланшетного ридера.
- Не смешивайте и не используйте компоненты из различных лотов. Рекомендуется не менять лунки разных плашек даже одного лота. Наборы могут транспортироваться или храниться в разных условиях и в результате характеристики связывания у плашек могут отличаться.

- Некоторые реагенты содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ в качестве консервантов. В случае их контакта с глазами или кожей, промойте этот участок водой.
- Химикаты и готовые и использованные реагенты должны быть утилизированы как биологически опасные в соответствии с региональными нормами.
- Информацию об опасных реагентах, используемых в этом наборе, вы можете найти в Паспорте безопасности. Он также доступен по запросу в ДРГ.

4 КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

1. **Микротитровальные стрипы**, 12x8 стрипов, делимые, 96 лунок. Стрипы покрыты антигенами Bordetella pertussis/toxin (вкл. 1 держатель для стрипов и 1 пленки для накрывания)
2. **Раствор для разведения образцов***, 1 флакон, 100 мл. Готов к использованию, желтого цвета, pH 7.2 ± 0.2,
3. **Сорбент IgG-RF***, 1 флакон, 6.5 мл, готов к использованию, желтого цвета
4. **Положительный контроль ***, 1 флакон, 2,0 мл., готов к исп., желтого цвета, красный колпачок
5. **Отрицательный контроль ***, 1 флакон, 2,0 мл., готов к исп., желтого цвета, желтый колпачок
6. **Cut-off контроль**, 1 флакон, 2,0 мл, готов к исп., желтого цвета, черный колпачок.
7. **Ферментный конъюгат ***, 1 флакон, 20 мл, готов к исп., красного цвета (кроличьи антитела IgA, конъюгированные пероксидазой хрена)
8. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готов к исп., 3,3',5,5'-тетраметилбензидин
9. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, серная кислота, 0.2 моль/л
10. **Промывочный раствор***, 1 флакон, 30 мл (20X конц. для 600 мл готового раствора), pH 6.5 ± 0.1

* содержит нертутный консервант

4.1.1 Оборудование и материалы, не входящие в набор:

- Микропланшетный ридер (450/620 нм)
- Калибровочные микропипетки различного объема
- Инкубатор 37 °C
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки
- Вортекс
- Деионизированная или (свежая) дистиллированная вода
- Таймер
- Абсорбирующая бумага

4.2 Стабильность и хранение

Невскрытые реагенты стабильны до даты срока годности, указанной на этикетке при хранении при 2 - 8 °C.

Открытые реагенты должны храниться при 2 - 8 °C. Микропланшет должен храниться при 2 - 8 °C. После вскрытия он должен быть плотно закрыт.

Вскрытый набор сохраняет активность до 2 месяцев при условиях хранения описанных выше.

4.3 Приготовление реагентов

Рабочий промывочный раствор

Развести промывочный раствор **1+19** (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий дистиллированной водой.

Потребление: ~5 мл на определение

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °C на водяной бане. Убедитесь, что все кристаллы растворились, прежде чем начнете постановку.

Стабильность после разведения: 4 недели при 2 ÷ 8 °C

4.4 Утилизация набора

Утилизация набора должна проводиться в соответствии с национальными регламентами. Специальная информация есть в Паспорте Безопасности.

4.5 Повреждение набора

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, ДРГ должно быть проинформировано в письменной форме, самое позднее в течение 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не могут быть использованы в постановках. Они должны храниться в холодильнике до финального решения. После этого они должны быть утилизированы в соответствии с официальными нормами.

5 ОБРАЗЦЫ

Сыворотка или плазма могут использоваться для анализа.

Не использовать гемолитические, иктерические или липемические образцы.

Образцы, содержащие азид натрия, не должны использоваться в анализе.

Забор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь венопункцией, дайте свернуться и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания крови. У образцов пациентов с антикоагулянтной терапией на свертывание может потребоваться больше времени.

Плазма:

Собрать цельную кровь в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт, и центрифугировать немедленно после забора.

5.2 Хранение образцов

Образцы могут храниться до 24 часов при 2 – 8 °C перед исследованием.

В случае более длительного промежутка времени до исследования образцы должны храниться при -20 °C (до года). Перед исследованием размороженные образцы следует несколько раз перевернуть. Избегайте повторного замораживания/размораживания.

5.3 Разведение образцов

Перед постановкой каждый образец пациента сначала необходимо развести *Раствором для разведения образцов*. Для абсорбции ревматоидного фактора эти предварительно разведенные образцы нужно инкубировать с IgG-RF-Сорбентом.

1. Развести каждый образец пациента **1+50 Раствором для разведения образцов**, напр., 10 мкл образца + 0.5 мл *Раствора для разведения (хорошо смешать)*.
2. Хорошо перемешайте IgG-RF-Сорбент перед использованием.
3. Разведите уже разведенные образцы **1+1** с IgG-RF-Сорбентом. напр., 60 мкл разведенного образца + 60 мкл *IgG-RF-Сорбента*. **Хорошо перемешать.**

4. Дайте постоять примерно 15 минут при комнатной температуре, хорошо перемешайте или оставьте стоять на ночь при 2 – 8 °С и хорошо перемешайте.
 5. Отберите 100 мкл подготовленного таким образом образца для анализа.
- Примечание:** Контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- **Очень важно довести все компоненты до комнатной температуры перед началом анализа!**
- После начала анализа он должен быть закончен без перерывов
- Используйте одноразовые наконечники для каждого стандарта во избежание контаминации.
- Абсорбция это функция времени инкубации и температуры. Перед началом анализа рекомендуется подготовить все реагенты, открыть крышки, закрепить лунки в держателе и т.д. Это поможет выдержать одинаковые временные интервалы во время раскапывания.
- Согласно общему правилу ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.
- Сразу после использования закройте плотно флаконы, чтобы избежать испарения и контаминации.
- Чтобы предотвратить кросс-контаминацию и получение ложных результатов вносите образцы пациента и конъюгат без разбрызгивания, аккуратно на дно лунки.
- На время инкубации зарывайте лунки чтобы избежать испарения.

6.2 Процедура

Перед проведением анализа необходимо развести *Промывочный раствор*, **подготовить образцы пациента как описано выше** и составить **схему распределения и идентификации образцов и контролей** с помощью формы, вложенной в набор.

1. Отобрать требуемое количество микротитровальных стрипов или лунок и поместить их в держатель.
Разместите по меньшей мере:

1 лунка	(напр., A1)	для бланка субстрата,	
1 лунка	(напр., B1)	для отрицательного контроля	
2 лунки	(напр., C1+D1)	для	Cut-off
1 лунка	(напр., E1)	для положительного контроля.	контроля

 На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.
 2. Раскапать:
 - 100 мкл** готового к использованию Отриц. контроля в лунку B1,
 - 100 мкл** готового к использованию Cut-off контроля в лунки C1 и D1
 - 100 мкл** готового к использованию Положит. контроля в лунки E1
 - 100 мкл** каждого разведенного образца пациента новыми одноразовыми наконечниками в оставшиеся лунки согласно схеме распределения. Оставить лунку A1 для бланка субстрата!
 3. Накрыть лунки пленкой, поставляемой в наборе. Инкубировать **1 час при 37 °С**.
 4. Удалить содержимое лунок и промыть их **5 раз (300 мкл на лунку)** рабочим промывочным раствором. В конце осторожно удалить остатки жидкости, выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!
- Примечание:**
Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.
5. Раскапать **100 мкл** готового к употреб. Ферментного конъюгата **во все лунки кроме A1**.
 6. Инкубировать **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °С)**.
Не подвергать воздействию прямого солнечного света!
 7. Удалить содержимое лунок и промыть их **5 раз (300 мкл на лунку)** рабочим промывочным раствором. В конце осторожно удалить остатки жидкости, выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!
 8. Внести **100 мкл** готового к употреблению Раствора субстрата **во все** лунки.
 9. Инкубировать **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ÷ 25 °С) в темноте**.
 10. Остановить реакцию, добавив **100 мкл стоп-раствора во все** лунки.
Любое голубое окрашивание проявившееся во время инкубации переходит в желтое.
- Примечание:** высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!
11. Считать ОП **в течение 30 минут** после добавления стоп-раствора.

6.3 Измерение

Настроить микропланшетный ридер для ELISA на нуль используя **бланк субстрата в лунке A1**.

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на нуль используя бланк субстрат в лунке A1, вычитайте значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции.

Измерить абсорбцию во всех лунках при 450 нм и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в схему.

Двойная длина волны – рекомендуется считывать на 620 нм как референтной длине волны. Где применимо, рассчитать среднее значение абсорбции всех дублей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Оценка надежности результатов

Постановка анализа может считаться действительной при соблюдении следующих условий:

Бланк субстрата в A1:	ОП ниже чем 0.100
Отриц. контроль в B1:	ОП ниже чем 0.200
Cut-off Контроль в C1/D1 :	ОП в диапазоне 0.350 – 0.850
Полож. контроль в E1:	ОП в диапазоне 0.650 – 3.000

7.2 Расчет

Среднее значение абсорбции Cut-off Контроля (СО)

Рассчитать среднее значение абсорбции двух **Cut-off** контролей (напр. в C1/D1).

Пример: (0.49 + 0.51) : 2 = 0.50 = СО

7.3 Интерпретация

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ (Среднее) значение абсорбции пациента более чем на 10 % больше СО
(Сред. ОП пациента > 1.1 x СО)

(Среднее) значение абсорбции пациента на 10 % больше и на 10 % меньше СО
повторить анализ через 2 - 4 с новыми образцами пациента
(0.9 x СО ≤ Сред. ОП пациента ≤ 1.1 x СО)

Результаты второй раз в серой зоне ⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ**

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ (Среднее) значение абсорбции пациента более чем на 10 % меньше СО
(Сред. ОП пациента < 0.9 x СО)

Результат в единицах ДРГ (DU):

Среднее значение абсорбции пациента * 10
_____ = (единицы ДРГ (DU))

CO

Пример: $\frac{1.580 * 10}{0,50} = 32 \text{ DU}$

Интерпретация результатов:

Значение Cut-Off:	10	DU
Серая зона:	9-11	DU
Отрицательный	< 9	DU
Положительный	> 11	DU

8 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Лабораторная практика требует, чтобы контроль должен быть проанализирован с каждой калибровочной кривой. Статистически значимое число контролей должно быть проанализировано, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны для обеспечения нормального режима работы лаборатории. Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормами. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечения повседневной достоверности результатов. Используйте контроли с нормальными и патологическими уровнями. Контроли и соответствующие им результаты полученные Лабораторией Контроля Качества указаны в Паспорте Качества приложенном к набору. Значения и диапазоны указанные на листе КК всегда относятся к текущему лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов. Также рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для того, чтобы обеспечить точность результатов. Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и тенденций. Если результаты анализа не соответствуют установленным приемлемым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента должны быть признаны недействительными. В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические параметры: пипетирование и таймеры; фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирацию и методы промывки. После проверки указанных выше элементов, не найдя ошибок, свяжитесь с вашим дистрибьютором или ДРГ напрямую.

9 ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяется как вероятность того, что анализ покажет отрицательный результат при отсутствии определяемого вещества.

Она составляет 92.5 %.

9.2 Чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется как вероятность того, что анализ покажет положительный результат при наличии определяемого вещества.

Она составляет 97.3 %.

10 ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

На значения абсорбции могут повлиять бактериальная контаминация и повторная заморозка/разморозка образца. Новорожденные и пациенты с иммунодефицитом результаты имеют ограниченное значение.

10.2 Интерферирующие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0.5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты исследования.

11 ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен быть выполнен в соответствии с инструкциями изготовителя по применению. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правила GLP (хорошей лабораторной практики) или других применимых национальных стандартов и/или законов. Это особенно актуально для использования контрольных реагентов. Важно всегда включать, в рамках проведения анализа, достаточное количество контролей для проверки достоверности и точности теста. Результаты действительны, только если все контроли находятся в пределах заданного диапазона, и, если все остальные параметры теста, также в рамках данных характеристик анализа. В случае каких-либо сомнений, пожалуйста, свяжитесь с ДРГ.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения никогда не должны быть основаны только на результатах лабораторных анализов, даже если результаты всех тестов находятся в согласии, как указано в пункте 11.1. Любой лабораторный результат только часть общей клинической картины пациента. Только в тех случаях, когда результаты лабораторных исследований соответствуют общей клинической картине, может быть сделано терапевтическое заключение. Результат теста никогда не должен быть единственным определяющим фактором для получения любого терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и/или обмен или замена каких-либо компонентов разных партий из одного набора на другой может негативно сказаться на ожидаемых результатах и обоснованности анализа вообще. В случае таких изменений и/или замен любое требование о замене набора недействительно. Претензии, поданные в связи с неверной интерпретацией результатов анализа клиентом, в соответствии с пунктом 11.2. также недействительны. Несмотря на это, в случае каких-либо претензий, ответственности производителя не должна превышать стоимость набора. Вред, причиненный набору при транспортировке, не подлежит ответственности производителя.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»

ул. Чорновола, 97

г. Ивано-Франковск, 76005

тел.: +38 (0342) 775 122

факс: +38 (0342) 775 123

e-mail: info@diameb.ua

www.diameb.com

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»