



Набор ИФА для определения антител класса IgG к вирусу *Bordetella pertussis/toxin*

Кат. номер : EIA-3450
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

Методика от 11-2009
Версия 10.0

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

1. ВВЕДЕНИЕ

Набор ИФА DRG *Bordetella pertussis/toxin IgG* содержит материалы для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к вирусу *Bordetella pertussis* и *Bordetella pertussis toxin* в сыворотке.

Анализ предназначен только для диагностического использования *in vitro*.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящий набор является твердофазным иммуоферментным анализом (ELISA). Лунки на микротитровальном планшете в качестве твердой фазы покрыты антигеном вируса *Bordetella pertussis/toxin*.

Разбавленные образцы пациентов и готовые к использованию контроли раскапываются в эти лунки. В течение инкубации специфические антитела вируса *Bordetella pertussis/toxin* положительных образцов и контролей связываются с зафиксированными антигенами.

После этапа промывки для удаления несвязанного образца и контрольного материала, в лунки вносятся анти-человеческие IgG антитела, конъюгированные пероксидазой хрена. В течение второй инкубации этот анти-IgG конъюгат связывается специфически с IgG антителами, приводя к образованию фермент-связанных иммунных комплексов.

После второго этапа промывки для удаления несвязанного конъюгата, образовавшиеся иммунные комплексы (в случае положительных результатов) обнаруживаются путем инкубации с TMB субстратов и развитием синего цвета. Синий цвет превращается в желтый после остановки ферментной реакции серной кислотой.

Интенсивность этого цвета прямо пропорциональна количеству специфического IgG антитела вируса *Bordetella pertussis/toxin* в образце пациента. Абсорбция при 450 нм считывается при использовании микротитровального планшеточного считывателя для ELISA.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Настоящий набор предназначен только для использования в диагностике *in vitro*.
- Используйте только действующую версию инструкции по применению, которая поставляется в наборе.
- Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ 1/26 поверхностному антигену гепатита В и вирусу гепатита С. Однако, во время использования и уничтожения все реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные.
- Контроли и стандарты в культурах клеток оказались неинфекционными.
- Избегайте контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 моль/л H₂SO₄. Он может вызывать раздражение кожи и ожоги.
- Никогда не раскапывайте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курите, не принимайте пищу, не пейте и не наносите косметику на территории, где обрабатываются образцы или реагенты набора.
- Надевайте одноразовые перчатки из латекса при обработке образцов и реагентов. Микробиологическое заражение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.
- Обращение должно соответствовать процедурам, указанным в соответствующих государственных руководствах или правилах по биологической безопасности.
- Не используйте реагенты после даты истечения срока годности, которая указана на этикетках набора.

- Согласно протоколу анализа необходимо следовать всем рабочим объемам реагентов. Оптимальные результаты анализа можно получить только при использовании откалиброванных дозаторов и микротитровальных планшеточных считывателей.
- Не смешивайте и не используйте компоненты наборов с различными номерами партий. Рекомендуется не заменять лунки различных планшетов, даже одной и той же партии. Возможно, что наборы поставлялись и хранились в различных условиях, и связывающие качества планшетов могут в некоторой степени отличаться.
- Исходя из соответствующих государственных руководств или правил по биологической безопасности, химические вещества, и подготовленные или использованные реагенты должны рассматриваться как опасные отходы.
- За информацией относительно опасных веществ, входящих в набор, просьба обращаться к Спецификациям Безопасности Материала. Спецификации Безопасности Материала предоставляются по запросу непосредственно от компании DRG.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Содержание набора

1. Микротитровальные лунки, 12x8 полосок (разламываемые), 96 лунок покрытых антигенами *Bordetella pertussis* и *Bordetella pertussis toxin*.

(Включая 1 держатель для полосок и 1 накрываемую фольгу.

2. Раствор для разведения образцов***, 1 флакон, 100 мл, готов к употреб., желтого цвета; pH 7.2 ± 0.2.

3. Положительный контроль***, 1 флакон, 1,0 мл готов к использ., желтого цвета, красный колпачок.

4. Отрицательный контроль***, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использ., желтого цвета, желтый колпачок.

5. Cut-off контроль***, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использ.; желтого цвета, черный колпачок.

6. Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 20 мл, готов к использ., красного цвета, антитела к человеческому IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена.

7. Раствор субстрата, 1 флакон, 14 мл готов к использ., тетраметилбензидин (TMB).

8. Стоп-раствор, 1 флакон, 14 мл готов к использ., содержит 0,5 моль/л H₂SO₄.

Избегайте контакта со стоп раствором. Он может вызвать раздражения кожи и ожоги.

9. Промывочный раствор*, 1 флакон, 30 мл (концентрированный 20x для 600 мл); pH 7.2 ± 0.2 см. см. «Подготовка реагентов».

*⇒ содержит 0.03 % ProClin 300

**⇒ содержит 0.3 % ProClin 300+0.01 % гентамицина сульфата

***⇒ содержит 0.03 % ProClin 300+0.015 % 5-бромо-5-нитро-1,3-диоксан (BND) + 0.010 % 2-метил-2Н-изотиазол-3-дин (MIT).

4.1.1 Требуемые, но не поставляемые материалы

- Микротитровальный планшеточный откалиброванный считыватель (450/620нм +/- 10нм).
- Откалиброванные микропипетки разного объема.
- Инкубатор на 37°C.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Вихревой смеситель пробирок.
- Деионизированная или свежая дистиллированная вода.
- Таймер.
- Абсорбирующая бумага.

4.2 Хранение и стабильность набора

При температуре хранения от 2 до 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты использовать не рекомендуется.

Вскрытые реагенты должны храниться при 2 – 8°C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2 – 8°C. После вскрытия пакета из фольги, необходимо его плотно закрывать. Вскрытые наборы сохраняют активность в течении 4 месяцев при хранении как указано выше.

4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием необходимо привести все реагенты и необходимое количество полосок к комнатной температуре.

Промывочный раствор

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

Потребление: ~5 мл на определение.

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37°C на водяной бане.

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

4.4 Уничтожение набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с официальными государственными правилами. Вся необходимая информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в оригинале инструкции).

4.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Не рекомендуется тестировать поврежденные наборы.

5. ОБРАЗЦЫ

В данном анализе может использоваться сыворотка.

Не использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь стандартным методом венепункции (напр. Sarstedt Monovette № 02.1388.001), дать свернуться и отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте, пока кровь полностью не свернулась. Пациенты, проходящие антикоагулянтную терапию, могут потребовать больше времени для свертывания.

5.2 Хранение образцов

Образцы должны быть закрытыми, их необходимо хранить до 24 часов при температуре 2-8°C до начала анализа и должны быть заморожены только раз до -20°C для хранения в течении более длительного периода. Размороженные образцы необходимо несколько раз перевернуть перед анализом.

5.3 Разведение образцов

Развести каждый образец пациента **1+100** раствором для разведения образцов.

Напр., 10 мкл образца + 1 мл раствора для разведения образцов, **хорошо смешать, оставить на 15 минут, снова хорошо смешать.**

Внимание: Контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие примечания

Внимательно прочитайте инструкцию перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от четкого следования инструкциям.

- **Перед использованием все реагенты довести до комнатной температуры.**

- Рекомендуется проводить процедуру непрерывно.

- Избегать контаминации реагентов, пипеток, и лунок/пробирок. Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для каждого реагента или образца.

- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, извлечь крышки, установить лунки в держатель и т.д. Это обеспечит непрерывное проведение каждого этапа пипетирования.

- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

- Плотно закрывайте флаконы с реагентами сразу после использования во избежание испарений и микробной контаминации.

- После первого использования и последующего хранения проверяйте конъюгат и флаконы на предмет микробной контаминации перед следующим использованием.

- Чтобы избежать перекрестной контаминации и ложных результатов, распыляйте образцы пациентов и распределяйте конъюгат аккуратно на дно лунок, не разбрызгивая их.

- Во время инкубации накрывайте микротитровальные полоски фольгой, чтоб избежать испарения.

6.2 Процедура анализа

Перед проведением анализа необходимо разбавить промывочный раствор, **приготовить образцы пациентов как описано в п. 5.3**. Перед пипетированием хорошо перемешайте и составьте **схему распределения и идентификации** с помощью схемы, вложенной в набор.

1. Выберите необходимое количество полосок или лунок и вкладывайте их в держатель.

Разместите согласно:

1 лунка (напр. А1) для субстрата бланка

1 лунка (напр. В1) для отрицательного контроля

2 лунки (напр. С1+D1) для cut-off контроля

1 лунка (напр. Е1) для положительного контроля

Пользователь должен определять контроли и образцы пациента в дубликаты при необходимости.

2. Накапайте:

100 мкл отрицательного контроля в лунку В1

100 мкл cut-off контроля в лунки D1+C1

100 мкл положительного контроля в лунку Е1

100 мкл каждого РАЗБАВЛЕННОГО, СМЕШАННОГО образца пациента новыми одноразовыми наконечниками в оставшиеся лунки согласно плану внесения.

Оставьте лунку А1 для субстрата бланка!

3. Накройте лунки фольговым покрытием, имеющимся в наборе, и инкубируйте **60 минут при 37°C**.

4. Вытряхните содержимое лунок. Промойте их **5 раз 300 мкл** разбавленным моющим раствором и удалите остатки жидкости, постукивая по тонкой бумаге.

ПРИМЕЧАНИЕ: Промывание очень важно. Неполное промывание приведет к получению неточных результатов и неправильной оценки значений абсорбции.

5. Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки **кроме А1**.

6. Накройте лунки фольгой. Инкубируйте **30 минут при комнатной температуре (20-25 °C)**.

НЕ поддавайте влиянию прямых солнечных лучей!

7. Вытряхните содержимое лунок. Промойте их 5 раз **300 мкл** разбавленным промывочным раствором и удалите остатки жидкости, постукивая по абсорбирующей бумаге.

8. Внесите **100 мкл** субстрата раствора во все лунки.

9. Накройте лунки фольгой. **Инкубируйте ровно 15 минут при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте.**

10. Внесите **100 мкл** стоп раствора во все лунки. Голубой цвет, появившийся во время инкубации, превращается в желтый.

ПРИМЕЧАНИЕ: высоко положительные образцы пациента могут создавать темные осадки хромогена.

11. Считайте оптическую плотность при **450/620** нм микропланшетным считывателем **в течении 30 минут** после добавления Стоп раствора.

6.3 ИЗМЕРЕНИЯ

Настроить микропланшетный считыватель для ELISA на ноль используя **бланк субстрата в лунке А1**.

Если по техническим причинам ELISA считыватель не может быть настроен на ноль используя бланк субстрат в лунке А1, вычитайте значение абсорбции лунки А1 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 распределения и идентификации.

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

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Надежность процедуры анализа

Постановка анализа может считаться действительной при соблюдении следующих условий:

- **Бланк субстрата в А1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.100**.
- **Отриц. контроль в В1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.200**.
- **Cut-off контроль (СО) в С1/D1:** ⇒ значение абсорбции между **0.350-0,850**.
- **Положит. Контроль в Е1:** ⇒ значение абсорбции более **0,600**.

7.2 Вычисление

Среднее значение абсорбции "Cut-off" контроля [СО]

Рассчитать среднее значение абсорбции 2 определений Cut-off контролей (напр., в С1/D1).

Пример: (0.54 + 0.56) ÷ 2 = 0.55 = СО

КО1

7.3 Интерпретация

Средние значения абсорбции образцов пациента более чем на 10 % выше СО
(Средняя ОП_{пациент} > 1.1 x СО)
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ

(Средние) значения абсорбции пациентов от 10 % выше до 10 % ниже СО

повторить анализ 2 - 4 недели спустя на новых образцах пациентов
($0,9 \times CO \leq \text{Средняя ОП}_{\text{пациент}} \leq 1,1 \times CO$)

СЕРАЯ ЗОНА

результат второго анализа опять
в «серой зоне»
ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ

(Средние) значения абсорбции пациента
более чем на 10 % ниже CO
(Средняя ОП_{пациент} < 0,9 x CO)
ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ

7.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

среднее значение абсорбции пациента x 10

$$\frac{\text{CO}}{\text{CO}} = [\text{ЕДИНИЦЫ ДРГ} = \text{ДЕ}]$$

$$1.580 \times 10$$

Пример: _____ = 29 ДЕ

$$0.55$$

Интерпретация результатов

Значение cut-off: 10 ДЕ
Серая зона: 9 - 11 ДЕ
Отрицательный: < 9 ДЕ
Положительный: > 11 ДЕ

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно местному законодательству. Использование контрольных образцов рекомендуется для подтверждения достоверности результатов каждый день. Используйте контроли здоровых и патологических уровней.

Рекомендуется также использовать национальные и международные программы оценки качества с целью обеспечения точности результатов. Если результаты анализа вне принятых уровней контрольных материалов, их нужно считать не действительными.

В этом случаи, пожалуйста, проверите следующее: оборудование для раскапывания и установки времени; фотометр; даты истечения срока годности реагентов, условия хранения и инкубации; методы аспирации и промывания.

После проверки выше указанного и в случае если ошибка не была обнаружена, свяжитесь со своим дистрибьютором.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА**9.1 Специфичность**

Диагностическая специфичность определяется как вероятность получения негативного результата при отсутствии специфического аналита.

Составляет 100%.

9.2 Чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется как вероятность получения позитивного результата при присутствии специфического аналита.

Составляет 94,9%.

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Бактериологическое заражение или повторные циклы замораживания/размораживания образцов может повлиять на значения абсорбции. Только в иммунокомпромиссных пациентов и новорожденных серологические данные имеют ограниченные значения.

11. ЮРИДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**11.1 Достоверность результатов**

Тест должен проводиться согласно инструкции производителя. Более того, потребитель должен точно соблюдать все правила надлежащей лабораторной практики и иные национальные стандарты/законы. Это касается в особенности использования контроль-реагентов. В процессе проведения анализа важно включать достаточное количество контролей для оценки точности теста. Результаты теста действительны, только если они отвечают нормам и если все параметры теста отвечают спецификации теста.

11.2 Терапевтическое заключение

Терапевтическое заключение не должно базироваться только на результатах лабораторных исследований, даже если они считаются

достоверными. Любой результат является только частью общей клинической картины пациента.

Диагностика инфекционного заболевания не может устанавливаться только на основе единственного результата теста. Точная диагностика должна учитывать всю клиническую картину пациента (историю, симптомы, сывороточные данные). Только в случаях, когда лабораторные результаты совпадают с нормами и общей картиной пациента, можно делать терапевтическое заключение.

Только результаты этого теста не могут быть основой для терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и/или замена или компонентов разных лотов с одного набора или с другого может негативно влиять на результаты и весь тест. Такая замена не может быть основой для претензий или просьбы о замене набора.

Претензии в случаях неправильного использования набора лабораторией тоже не могут являться действительными. В обязанность производителя не входит замена или возвращение стоимости набора при невнимательном его использовании или неправильном транспортировании.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»

Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.com

www.diameb.com