



Набор для определения

Bordetella pertussis / toxin IgM

Bordetella pertussis / toxin IgM ELISA

Кат. № : 139-3451
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

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

Методика от 06-2008
Версия 8.0

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

DRG Bordetella pertussis / toxin IgM ELISA - это набор для обнаружения антител класса IgM к вирусу Bordetella pertussis/toxin в сыворотке человека.

Данный набор является твердофазным иммуоферментным анализом (ELISA). Образцы пациентов разбавляются веществом *Sample Diluent* и дополнительно инкубируются с *IgG-RF-сорбентом*, содержащим гипериммунное античеловеческое IgG антитело, с целью устранения конкурентного ингибирования из специфического IgG и исключения ревматоидных факторов. Данная подготовка помогает избежать ложноположительных или ложноотрицательных результатов.

Микротитровальные стрипованные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигенами Bordetella pertussis/toxin и гемоглиутинином. Разведенные образцы пациента и готовые к использованию контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфичные к вирусу Bordetella антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляется конъюгат антител IgM человека с меткой пероксидазы хрена. Во время второй инкубации этот конъюгат связывается специфически с антителами IgM, 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 при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции.

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgM специфичных к вирусу Bordetella. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA - ридере.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для диагностики «ин-витро».
- Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ I/II, 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 прикапывайте 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 Состав 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 использ., желтого цвета; pH 7.2 * 0.2.
 3. **IgG-RF-сорбент*****, 1 флакон, 6,5 мл, готов к использ., желтого цвета.
Содержит анти-человеческое IgG антитело.
 4. **Положительный контроль*****, 1 флакон, 1,0 мл готов к использ., желтого цвета, красный колпачок.
 5. **Отрицательный контроль*****, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использ., желтого цвета, желтый колпачок.
 6. **Cut-off контроль*****, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использ.; желтого цвета, черный колпачок.
 7. **Ферментный конъюгат****, 1 флакон, 20 мл, готов к использ., красного цвета, антитела к человеческому IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена.
 8. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл готов к использ., тетраметилбензидин (ТМБ).
 9. **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.
10. **Промывочный раствор***, 1 флакон, 30 мл (концентрированный 20x для 600 мл); pH 7.2 * 0.2 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-один (MIT).

4.1.1 Необходимые но не поставляемые материалы

1. Микротитровальный планшеточный калибровочный ридер (450/620нм +/- 10нм).
2. Калибровочные микропипетки разного объема.
3. Инкубатор на 37°C.
4. Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
5. Вortexный трубчатый миксер.
6. Деионизированная или свежая дистиллированная вода
7. Таймер.
8. Абсорбирующая бумага.

4.2 Стабильность и хранение

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
Рабочий 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 °С на водяной бане. Стабильность после разведения: 4 недели при 2 + 8 °С.

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. Их следует сохранять до принятия окончательного решения. После этого их следует утилизировать согласно правилам.

5. Образцы

В данном исследовании может использоваться сыворотка.

Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре. Не центрифугируйте, пока кровь полностью не свернулась. Пациенты, проходящие антикоагулянтную терапию, могут потребовать больше времени для свертывания.

5.2 Хранение образцов

Перед исследованием образцы должны храниться накрытыми в течение 24 часов при температуре 2-8°C. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°C. Оттаявшие образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

5.3 Разведение образцов

Перед исследованием развести каждый образец пациента раствором для разведения образцов. Для абсорбции ревматоидного фактора эти предварительно разведенные образцы должны потом инкубироваться 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 образцов. **Хорошо смешать.**

2. Хорошо смешайте IgG-RF-сорбент перед использованием.
3. Разведите этот предварительно разведенный образец 1+1 IgG-RF-сорбентом.

Напр., 60 мкл предварительно разведенного образца + 60 мкл IgG-RF-сорбента. **Хорошо смешайте.**

4. Оставьте раствор хотя бы на 15 минут при комнатной температуре, хорошо смешайте, **или** на ночь при температуре от 2 до 8°C и опять хорошо смешайте.
5. Возьмите 100 мкл этих предварительно обработанных образцов для ELISA.

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

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

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 шага 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, раскапывайте 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, подготовить образцы пациентов, как описано в п. 5.3, 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 лунок (напр., C1+D1)	для Cut-off контроля, и
1 лунка (напр., E1)	для положительного контроля.

На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.

2. Раскапать:

100 мкл **готового к использ.** отрицательного контроля в лунки B1,
100 мкл **готового к использ.** "cut-off" контроля в лунки C1+D1,
100 мкл **готового к использ.** положительного контроля в лунку E1 и

100 мкл **каждого разведенного** образца пациента с **новыми одноразовыми наконечниками** в оставшиеся лунки согласно схеме. **Оставить лунку A1 для бланка субстрата!**

3. Накрыть лунки пленкой поставляемой в наборе. Инкубировать: **1 час при 37 °С.**

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

Примечание:

Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.

5. Раскапать: **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки, **кроме A1**

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

Не подвергать воздействию прямого солнечного света!

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 °С) в темноте.**

10. Раскапать: **100 мкл** стоп-раствора (как и ТМБ) **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 оптическую плотность при 450/620 нм микротитровальным планшетным ридером в течении **30 минут** после добавления стоп раствора.

6.3 Измерение

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

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на ноль 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.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ**7.1 Надежность процесса 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 in E1** ⇒ значение абсорбции более **0,700**.

7.2 Вычисление**Среднее значение абсорбции "Cut-off" контроля [СО]**

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

Пример: $(0.59 + 0.61) \div 2 = 0.60 = СО$

7.3 Интерпретация

Средние значения абсорбции образцов пациента
более чем на **10 % больше СО**

(Средняя ОП_{пациент} > 1,1 x СО)
⇒ **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

(Средние) значения абсорбции пациентов
от **10 % выше до 10 % ниже СО**
⇒ **серая зона ⇒ повторить анализ**

2 - 4 недели спустя – на новых пробах пациентов

$(0,9 \times СО \leq \text{Средняя ОП}_{\text{пациент}} \leq 1,1 \times СО)$

результат второго анализа опять

в «серой зоне»
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

средние значения абсорбции пациента
более чем на **10 % ниже СО**

(Средняя ОП_{пациент} < 0,9 x СО)
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

7.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

среднее значение абсорбции пациента x 10

_____ = [DRG UNITS = DU]
СО

1.580 x 10

Пример: _____ = **26 DU**

0.60

Интерпретация результатов

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

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 анализата.

Составляет 100%.

9.2 Чувствительность

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

Составляет 94%.

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