

# НАБОР ИФА ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К ИНФЕКЦИИ LEPTOSPIRA BIFLEXA

**8208-35, Leptospira IgM**

Каталог. № : 8208-35  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 23-06-2008



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

## ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор DAI LEPTOSPIRA IgM Microwell ELISA - иммуноферментный анализ (ELISA), предназначен для определения антител к *Leptospira biflexa* (serovar patoc 1) для серологического подтверждения инфекций в сыворотке и плазме. Данный анализ предназначен только для использования опытным лабораторным персоналом.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Клинические проявления лептоспироза начинаются от легкой простудной болезни и заканчиваются иктерической болезнью с серьезным последствием для печени и почек. Естественными носителями лептоспироза являются грызуны, также как и большое количество домашних млекопитающих. Организмы занимают полость почечных канальцев в их естественной области обитания и удаляются через мочу. Заражение человека происходит от прямого контакта с инфицированным животным (например, ветеринарами, работниками скотобойни или обрабатывающими молочные продукты) или контакта с территориями, зараженными животными носителями (например, сельскохозяйственными рабочими). Прием ванны или плавание в водных источниках, около которых пасся домашний скот, оказался потенциально инфекционно опасным. Организмы проникают в организм «хозяина» сквозь царапины на коже, поверхности слизистой или глаз. Инкубационный период может длиться от 3 до 30 дней, но обычно от 10 до 12 дней. Антитела могут стать обнаруживаемыми с 6-го по 10-й день болезни и достигать самых высоких уровней в пределах от 3 до 4 недель. Затем уровни антител постепенно снижаются, но могут оставаться обнаруживаемыми в течение многих лет.

Эпидемиологические факторы, клинические результаты, контакт с эндемическими регионами и другие лабораторные результаты должен приниматься во внимание при диагностировании острого заболевания. Диагностика острого заболевания также во многих случаях включает положительное лабораторное подтверждение. Этот анализ разработан для определения острых инфекционных болезней вызванных лептоспирозом. Подтверждение положительного образца должно сопровождаться дополнительными методами.

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Микролунки покрыты антигеном лептоспироза *Patoc 1*. В течение первой инкубации с разбавленными сыворотками пациентов любые антитела, взаимодействующие с антигеном связываются с покрытыми лунками. После промывки для удаления остатка образца добавляется ферментный конъюгат. Если антитела закрепились на лунках, таким образом ферментный конъюгат свяжется с этими антителами. После другой серии промывок добавляется хромоген (тетраметилбензидин/ТМВ). При наличии ферментного конъюгата пероксидаза катализирует реакцию, которая использует пероксид и превращает хромоген из прозрачного в синий. Добавление стоп раствора останавливает реакцию и превращает синий цвет в ярко-желтый. После этого реакцию можно считать визуально или с помощью иммуноферментного считывателя (ELISA).

## РЕАГЕНТЫ

Позиция	Описание
Полоски для анализа	Микролунки, содержащие антиген лептоспироза - 96 лунок в рамке для полосок.
Ферментный конъюгат:	1 бутылка с 11 мл анти-человеческого IgM антитела, конъюгированного с пероксидазой.
Положительный контроль	1 флакон с 1 мл разбавленной IgM положительной сыворотки человека.
Отрицательный	1 флакон с 1 мл разбавленной IgM

контроль	отрицательной сыворотки человека.
Хромоген	1 бутылка с 11 мл хромогена тетраметилбензидина (ТМВ).
Абсорбент РФ	1 бутылка с 5 мл козлиного анти-человеческого IgG.
Промывочный концентрат (20x)	1 бутылка с 25 мл концентрированного буфера и поверхностно-активного вещества.
Буфер для разбавления	2 бутылки с 30 мл раствора буферизованного раствора белка.
Стоп раствор	1 бутылка с 11 мл 1М фосфорной кислоты.

## ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не используйте растворы, если они выпадают в осадок или становятся мутными. Промывочный концентрат может кристаллизироваться во время хранения при 2-8°C. Кристаллизация исчезает после разбавления до рабочего состояния.

Буфер для разбавления является коллоидным раствором. Он кажется непрозрачным и содержит осадок.

Не используйте сыворотку, которая, возможно, использовалась для поддержки роста микроорганизмов, или мутную сыворотку исходя из насыщенного содержания липидов. Образцы с высоким содержанием липидов должны быть перед использованием очищены.

Обращайтесь со всеми сыворотками как будто с инфекционными. Отрицательный контроль был проверен необходимыми методами и оказался отрицательным к поверхностному антигену гепатита В и к ВИЧ антителам.

Это изделие должно использоваться с соблюдением соответствующих условий безопасности, которые использовались бы для любого потенциально инфекционного носителя.

Не добавляйте азиды к любым из реагентов набора.

## ХРАНЕНИЕ

Реагенты, полоски и компоненты в бутылках:

Хранить при 2-8°C.

Гибкая бутылка с разбавленным промывочным буфером может храниться при комнатной температуре.

## ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫЙ МАТЕРИАЛ

Сыворотки, используемые для положительных и отрицательных контролей (поставляются отдельно) были проверены одобренным FDA методом и оказались отрицательными (не повторно реактивными) на наличие антитела к вирусу иммунодефициту человека (ВИЧ), также как и к поверхностному антигену гепатита В. Поскольку не существует никакого метода, дающего полную уверенность в отсутствии ВИЧ, вируса гепатита В или других возбудителей инфекций, с образцами, также как и с контролями необходимо обращаться с соблюдением 2 уровня биобезопасности, как рекомендуется при использовании любой потенциально инфекционной человеческой сыворотки или образца крови.

## СБОР И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Данный анализ необходимо проводить с использованием сыворотки. Сыворотка может храниться при 2-8°C до 5 дней. Сыворотку можно заморозить до -20°C при более длительном хранении. Не рекомендуется замораживать образцы цельной крови.

Одиночные образцы используются для оценки предрасположения; два образца, собранные в разный период от одних и тех же людей используются для сероконверсии. **Пары образцов необходимо анализировать в одно и тоже время.** Рекомендуется, что бы образец выздоравливающего человека был собран в пациента, демонстрирующего или первоначально неактивный или слабо реактивный результат.

## ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Промывочный буфер – снимите колпачок и добавьте содержимое бутылки к 475 мл дистиллированной воды. Перенесите разбавленный промывочный буфер в гибкую бутылку.

**Замечание:** промывки состоят из заполнения до края каждой лунки, встряхивания содержимого и обратного заполнения.

Избегать образования пузырьков в лунках в течение этапов промывки.

## ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Набор DAI LEPTOSPIRA IgM Microwell ELISA.

## Требуемые, но не поставляемые материалы

- Пипетки.
- Гибкая бутылка для промывки полосок (рекомендуется узкий наконечник).
- Подготовленная для реагентов вода (дистиллированная) и мерная колба.
- Пробирки для разбавления образца.

- Промокательная бумага

#### Рекомендуемые материалы

- Планшеточный считыватель ELISA для считывания планшетов с фильтром 450/620-650 нм (выборочно, результаты могут считываться визуально).

#### ПРОЦЕДУРА

**Промывочный буфер:** Удалите крышку и добавьте содержимое бутылки к 475 мл подготовленной для реагента воды. Поместите разбавленный промывочный буфер в гибкую бутылку с узким открытым наконечником.

**Примечание:** Промывание состоит из наполнения каждой ячейки до края, удаления содержимого и повторного заполнения.

Избегайте образования пузырей в лунках во время этапов промывки. Коагулируйте кровь и удалите сыворотку. Заморозьте образцы при  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже, если не используете в течении 5 дней.

Не инактивируйте сыворотку теплом и избегайте повторного замораживания и размораживания образцов.

**Анализируемые образцы:** приготовьте разбавления 1:40 сывороток пациентов, используя буфер для разбавления (напр., 10 мкл сыворотки и 390 мкл буфера для разбавления).

#### Проведение анализов

1. Отломите необходимое число лунок (две для контролей и для определенного количества образцов) и поместите в держатель для полосок.
2. Примечание: отрицательный и положительный контроли поставляются предварительно разбавленными. Дальше не разбавлять.

Разбавьте В БУФЕРЕ ДЛЯ РАЗБАВЛЕНИЯ сыворотку пациента 1:40. К 100 мкл разбавленной сыворотки добавьте 40 мкл абсорбента РФ. Хорошо перемешайте. Инкубируйте в пробирке в течении 5 минут.

НЕ ДОБАВЛЯЙТЕ абсорбент РФ к отрицательному и положительному контролям. Добавьте 100 мкл отрицательного и положительного контроля в лунки № 1 и 2 соответственно после первых 5 минут инкубации.

3. Перенесите все 140 мкл образцов для анализа в остальные лунки.
4. Инкубируйте при комнатной температуре ( $15-25^{\circ}\text{C}$ ) 10 минут.
5. Вытряхните содержимое и промойте 3 раза разбавленным промывочным буфером.
6. Добавьте 2 капли ферментного конъюгата в каждую лунку.
7. Инкубируйте при комнатной температуре 10 минут.
8. Вытряхните содержимое и промойте 3 раза промывочным буфером.
9. Постучите ячейками по бумажным полотенцам, чтобы удалить жидкость.
10. Добавьте в каждую лунку по 2 капли хромогена.
11. Инкубируйте при комнатной температуре 5 минут.
12. Добавьте по 2 капли стоп раствора и смешайте, постукивая по держателю.
13. Считайте в течении одного часа после добавления стоп раствора.

#### СЧИТЫВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Визуально:** посмотрите на каждую лунку против белого фона (например, бумажного полотенца) и зафиксируйте реакцию как чистая или +, ++ или +++.

**ELISA считыватель:** обнулите считыватель в рабочем режиме. Установите бихроматические считывания при 450/620-650 нм.

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Использование контролей позволяет облегчить проверку стабильности набора. Набор не должен использоваться если любой из контролей выходит за диапазон.

Ожидаемые значения для контролей:

**Отрицательный** – 0,0 до 0,3 единицы ОП.

**Положительный** – 0,5 единиц ОП и выше.

#### ОБНАРУЖЕНИЕ И РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Отрицательный контроль значительно развил цвет.

**Причина:** Несоответствующие промывки.

**Исправление:** Удалите остаток жидкости из лунок постукивая ими на промокательном полотенце.

Не позволяйте анализируемым лункам высыхать.

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ АНАЛИЗА

**Изначально не реактивные:** образцы, интерпретируются как отрицательные (0,0 – 0,3 оп единиц или нулевой цвет) указывают, что антитело не присутствует в образце. Поскольку антитело может не присутствовать во время ранней стадии болезни (5-8 дней

инкубация), необходимо подтверждение 2-3 неделями спустя для лабораторного диагноза. В это время пациенты, показывающие слабую реакцию (0,5 -  $\leq 1,0$  или +, ++ ) должны дальше тестироваться альтернативными методами или повторно тестироваться 10-14 неделями спустя. Выздоровливающая сыворотка при значительной реакции ( $>1,0$  оп) показывает формирование антитела против лептоспир. Изначально отрицательные результаты с дальнейшими положительными подразумевают сероконверсию.

**Изначально слабо реактивные:** слабо реактивные образцы должны интерпретироваться с осторожностью. В нормальной популяции слабо реактивные образцы являются нечастыми, но возможными. Рекомендуется использование образцов, собранных 2-3 неделями спустя (пара острой и выздоравливающей сыворотки).  $>1,0$  оп второго образца подтверждает присутствие недавнего, специфического антитела. (внимание: если это перекрестно реактивное антитело, выздоравливающая сыворотка может не показать высший уровень антитела, чем острый образец). Если считывание образца остается  $\geq 0,5 - \leq 1,0$  оп или +, ++ вторая методология должна приниматься или образцы могут интерпретироваться как взятые сверх возрастающего титра (титр уменьшается).

**Изначально реактивные:** образцы, что интерпретируются как сильно реактивные ( $> 1,0$  оп или +++ или >), могут указывать на присутствие специфического антитела. Присутствующее антитело одно не можно использовать для диагностики острой инфекции, поскольку антитела от первого выделения могут циркулировать большой период времени.

#### ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

Серологические результаты - вспомогательное средство при диагностике, но не могут использоваться как единственный метод диагностики.

ELISA был проверен по отношению ко многим серовидам, но не может гарантировать одинакового взаимодействия штаммов. Не используйте в ветеринарных образцах.

Лечение часто проводят до подтверждения серологического диагноза, что требует по крайней мере 2 недели. Острый лептоспироз должен поддаваться лечению немедленно, не ожидая серологического подтверждения. Диагноз инфекции лептоспироза не должен основываться только на результатах ELISA, а вместе с другими клиническими заключениями и симптомами и лабораторными данными. При постановке диагноза должны учитываться эпидемиологические факторы, клинические данные, выделение к эндемическим регионам и другие лабораторные результаты.

При постановке диагноза должны приниматься во внимание эпидемиологические факторы, клинические результаты, предрасположение к эндемическим областям и другие лабораторные результаты.

Известно много видов лептоспир. Много видов являются географически доминантными в некоторых регионах, а в других нет. *Biflexa patos 1* известна как перекрестно реактивная со многими серовидами, но обычно не перекрестно реактивна со штаммами животных. Относительная сила реакций может варьировать в зависимости от антигена. Это нужно принимать во внимание во время интерпретации. Для подтверждения рекомендуется использование культуры или MAT (среднее время вхождения в связь) анализа, так как эти анализы являются специфическими к серовиду.

Поскольку метод серологического анализа может давать разные результаты для слабо реактивных образцов, рекомендуется использовать другой серологический метод (напр., альтернативный метод, который отдельно определяет IgM и IgG антитело).

#### Ожидаемые значения

Число антител положительных субъектов в популяции зависит от двух факторов: преобладания заболевания и клинических критериев, которые используются для тестирования популяции. Поскольку, только некоторые положительные результаты должны наблюдаться при случайном скрининге популяции на эндемической территории, большинство серологических тестов является неспецифическим даже при скрининге эндемической популяции. Даже в эндемической территории, серологический скрининг часто дает ошибочно положительные результаты, если используется для случайного скрининга пациента. Серологические тесты полезны для тестирования пациентов на эндемической территории с признаками и симптомами, совместимыми с заболеванием.

Уровни антител обычно низкие или отсутствуют во время ранней инфекции. Симптоматические пациенты могут не иметь антитела во

время 1-2 недели после проявления, и титр антитела увеличивается со временем.

#### **СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Параллельно с использованием другого имеющегося в продаже ELISA набора были проверены 50 образцов сыворотки. были получены следующие результаты:

	ELISA +	ELISA -
DAI ELISA +	11	4
DAI ELISA -	0	35

**Чувствительность: 11/11 = 100%**

**Специфичность: 35/39 = 90%**



#### **ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
е-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)