

НАБОР ИФА

ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgA/IgM АНТИТЕЛ К BORDETELLA PERTUSSIS™ В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА

A233-01E, SeroPertussis IgA/IgM

Каталог. № : **A233-01E**

Методика от **12-11-2013**

Количество : **96**

Производитель: **Savyon Diagnostics
Ltd., (Израиль)**



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

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор SeroPertussis™ IgA/IgM предназначен для качественного определения специфических IgA и/или IgM антител к *Bordetella pertussis* методом иммуноферментного анализа (ELISA).

Только для исследовательских целей.

Набор может быть использован и для определения только одного класса антител (IgA или IgM) и для определения обоих классов антител.

ВВЕДЕНИЕ

Коклюш (Pertussis) это острое инфекционное заболевание дыхательных путей, возбудителем которого являются грамотрицательные бактерии *Bordetella pertussis*, с высокой вероятностью заражения. У детей типичным признаком является спазматический кашель; приступы судорожного кашля, которые могут заканчиваться рвотой, продолжаются несколько недель.

Болезнь характеризуется высокой заболеваемостью, и смертностью, особенно у детей.

Pertussis является эндемическим заболеванием, но эпидемии случаются каждые 3 – 5 лет. В США ежегодно регистрируются 5000 – 7000 случаев. Встречаемость коклюша сильно снизилась после проведения массовых вакцинаций; однако коклюш встречается даже в странах, где в течение многих лет широко проводится противокклюшная прививка⁽¹⁾. Ежегодно во всем мире регистрируется около 50 миллионов случаев коклюша и около 350,000 человек погибают в результате заболевания⁽²⁾. Заболеваемость коклюшем неуклонно возрастает с 1980⁽³⁾. Иммуитет, индуцированный вакцинацией, ослабевает через 5 - 10 лет, и человек становится восприимчивым к инфекции. Неострые, стертые формы коклюша, без классических клинических стадий, могут наблюдаться при инфицировании людей, которым проведены прививки. Судорожный кашель встречается только в 6% таких случаев; вместо этого болезнь характеризуется обычным, длительным кашлем, сохраняющимся на протяжении нескольких недель или месяцев. Из-за отсутствия выраженных симптомов инфекция Pertussis часто остается не диагностированной у взрослых и подростков, которые могут быть резервуаром и источником инфекции для не вакцинированных детей⁽⁴⁾. Дети, которые еще слишком малы, чтобы пройти полную вакцинацию и те дети, у которых еще не завершена первая серия вакцинаций, относятся к группе наибольшего риска, у них заболевание протекает в наиболее тяжелой форме. Заболевание с очень высокой вероятностью заражения, при контакте с больными у восприимчивых людей заболевание развивается с частотой до 90%. Применение антибиотиков на ранней стадии снижает тяжесть симптомов, ведет к быстрому прекращению выделения бактерий, тем самым сокращая период возможной передачи инфекции. Быстрая идентификация случаев заболевания может помочь предохранить людей, не прошедших или не полностью прошедших вакцинацию, от инфицирования, путем вакцинации или антимикробной профилактики.

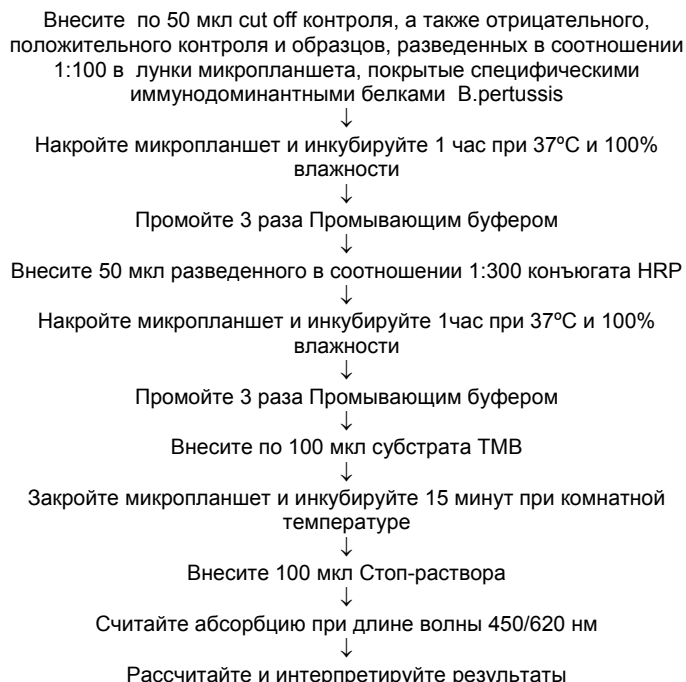
Лабораторная диагностика коклюша может проводиться и прямо, на клеточной культуре, ПИФ или ПЦР, и с помощью не прямых серологических исследований. Так как бактерия присутствует в течение первых двух недель после заражения, то ее идентификация прямыми методами возможна только на протяжении этого периода. Для прямого обнаружения предпочтительно использовать в качестве образцов аспираты или мазки из носоглотки.

Серологические тесты полезны при диагностике атипичной инфекции, при длительном кашле и в эпидемиологических целях. Повышенные уровни антител к токсину Pertussis (PT) и волокнам гемагглютинаина (FHA) могут рассматриваться как чувствительные серологические маркеры для диагностики Pertussis у взрослых и не вакцинированных детей⁽⁵⁾. Условием определения инфекции Pertussis у не вакцинированных детей, принятым ВОЗ, является увеличение уровня антител, любого из двух классов иммуноглобулинов, IgG или IgA, к одному или нескольким антигенам. У вакцинированных детей одна серологическая проба может быть диагностически значимой при Pertussis⁽⁶⁾. В наборах SeroPertussis IgG и SeroPertussis IgA/IgM в качестве антигенов использованы обогащенные фракции PT и FHA, что позволяет проводить чувствительный анализ на содержание IgA и/или IgM антител и полуколичественное определение IgG антител к *Bordetella pertussis*, дает возможность мониторинга иммунного ответа и кинетики антител.

ПРИНЦИП МЕТОДА

- Микропланшет, поставляемый в наборе SeroPertussis™, покрыт обогащенной фракцией токсина *Bordetella pertussis* и гемагглютинином.
- Тестируемые сыворотки разводят в соотношении 1:100 и инкубируют в лунках микроплшета SeroPertussis™. На этом этапе специфические антитела к *B. pertussis* связываются с иммобилизованным антигеном.
- Не специфические антитела удаляются при промывке.
- Добавляются антитела к IgA и/или IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP). На этом этапе конъюгат с HRP связывается с образовавшимся ранее комплексом антиген-антитело.
- Не связавшийся конъюгат удаляется при промывке.
- Субстрат TMB добавляется и гидролизует пероксидазой, с образованием голубого раствора восстановленного субстрата.
- После добавления стоп-раствора голубое окрашивание преобразуется в желтое. Затем измеряется абсорбция полученного раствора с помощью ИФА анализатора при длине волны 450/620 нм.
- Полученные значения абсорбции пропорциональны уровню специфических антител, которые связались с антигеном.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА



КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Набор предназначен для **96 определений**

Кат. № **A233-01E**

1. **Микропланшет, лунки которого покрыты антигеном *B. pertussis***: 96 лунок на «ломаемых» стрипах (8x12), покрытых антигенами *Bordetella pertussis*, упакованные в алюминиевый пакет, содержащий осушитель.

1 Микропланшет

2. **Концентрированный промывочный буфер (20 X)** : PBS - Tween буфер. Содержит менее 0.05% Проклина в качестве консерванта.

1 флакон, 100 мл

3. **Разбавитель образцов сыворотки:** Буферный раствор, готов к использованию. Содержит антитела к IgG человека и менее 0.05% Проклина в качестве консерванта.
1 флакон, 60 мл
4. **Разбавитель конъюгата:** Буферный раствор, готов к использованию. Содержит менее 0.05% Проклина в качестве консерванта.
1 флакон, 40 мл
5. **IgA и IgM Отрицательный контроль:** Сыворотка человека, не содержащая IgM и IgA к *B. Pertussis*. Содержит менее 0.05% Проклина и менее 0.1% азида натрия в качестве консервантов. Готов к использованию.
1 флакон, 2мл
6. **IgA и IgM Положительный контроль:** Сыворотка человека, содержащая IgA и IgM к *B.pertussis*. Содержит менее 0.05% Проклина и менее 0.1% азида натрия в качестве консервантов. Готов к использованию.
1 флакон, 2 мл
7. **IgA Cut off контроль:** Готовый к использованию стандарт, содержащий антитела IgA к *B.pertussis*, используется для определения уровня cut off. Содержит менее 0.1% азида натрия и менее 0.05% Проклина.
1 флакон, 2,5 мл
8. **IgM Cut off контроль:** Готовый к использованию стандарт, содержащий антитела IgM к *B.pertussis*, используется для определения уровня cut off. Содержит менее 0.1% азида натрия и менее 0.05% Проклина.
1 флакон, 2,5 мл
9. **Конъюгат IgA/HRP, концентрат (300X):** Пероксидаза хрена (HRP), конъюгирована с антителами к IgA (специфическая α цепь) человека. Содержит азид натрия в качестве консерванта.
1 флакон, 0,2 мл
10. **Конъюгат IgM/HRP, концентрат (300X):** Пероксидаза хрена (HRP), конъюгирована с антителами к IgM (специфическая μ цепь) человека. Содержит менее 0.05% Проклина в качестве консерванта.
1 флакон, 0,2 мл
11. **Субстрат ТМВ:** Готов к использованию. Содержит 3, 3', 5, 5' – хромоген тетраметилбензидин и субстрат – перекись.
1 флакон, 14 мл
12. **Стоп-раствор:** Готов к использованию. Содержит 1M H₂SO₄.
1 флакон , 15 мл
13. **Пленка для запечатывания микропланшета:**
1 шт.
14. **Инструкция:**
1

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Чистые пробирки для разведения образцов сыворотки.
2. Одноразовая пластиковая посуда для разведения концентрата конъюгата HRP.
3. Калиброванные дозаторы и многоканальные дозаторы (диапазоны объемов 5-50, 50-200 и 200-1000 мкл) и одноразовые сменные наконечники.
4. Мерный цилиндр объемом 1 л.
5. Мерный цилиндр объемом 50 мл.
6. Бутыль для промывочного буфера.
7. Фильтровальная бумага.
8. Вортекс.
9. Водяная баня 37°C с крышкой, или влажная камера, помещенная в инкубатор при 37°C.
10. ИФА анализатор с возможностью измерений при 450 и 620 нм.
11. Дистиллированная или дважды деионизированная вода.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для диагностики *In Vitro*

1. Данный набор содержит сыворотку человека, которая была протестирована методами, одобренными FDA, на содержание HBsAg и антител к HCV и HIV, и были получены отрицательные результаты. Так как не существует метода, который может полностью гарантировать, что материалы, полученные из крови человека, не содержат какой-либо инфекции, то со всеми компонентами, поставляемыми в наборе и содержащими материалы человеческого

- происхождения, а так же с образцами крови пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами, согласно рекомендациям, опубликованным в руководстве CDC/NIH "Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях, 1988".
2. Раствор субстрата ТМВ может вызывать раздражение кожи и слизистых оболочек. Избегайте прямого контакта.
3. Все компоненты данного набора прокалиброваны и каждый лот тестируется. Не рекомендуется смешивать компоненты из разных лотов, так как это может повлиять на результаты.
4. Разведенная серная кислота (1M H₂SO₄) может вызывать раздражение глаз и кожи. При попадании кислоты в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу.

ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

1. Все поставляемые в наборе реагенты должны храниться при 2-8°C. Не вскрытые реагенты стабильны вплоть до срока годности, указанного на упаковке набора. Пребывание невскрытых компонентов набора при температуре окружающей среды в течение нескольких часов не вредит реагентам. **НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ!**
2. Срок годности набора после вскрытия 90 дней.
3. Неиспользованные стрипы должны храниться в плотно закрытом (скрутить вскрытый конец пакета и плотно полностью заклеить его клейкой пленкой) алюминиевом пакете с осушителем.
4. В концентрате промывочного буфера при хранении в холодильнике могут образовываться кристаллы, это совершенно нормально. Перед разведением раствором кристаллы нагреванием концентрата буфера до 37°C. После разведения буфер стабилен при 2-8°C в течение 21 дня.

СБОР ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ

Сыворотку получают асептически, используя стандартные процедуры. Инактивированная нагреванием сыворотка не может быть использована. Не рекомендуется использование липемичных, мутных или загрязненных образцов. Присутствие взвеси или преципитата в сыворотке может быть причиной получения неправильных результатов. Такие образцы должны быть центрифугированы или профильтрованы перед тестированием.

ХРАНЕНИЕ

Образцы должны храниться при 2-8°C и могут быть протестированы в течение 7 дней (рекомендуется добавлять 0.1% азид натрия). Для более длительного хранения образцы необходимо алиquotировать и заморозить при температуре -20°C или ниже. Избегайте повторных циклов замораживания и оттаивания.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

Протокол автоматизированной процедуры предоставляется по запросу.

Та же процедура используется для IgA и IgM.

А. Подготовка реагентов

1. Все компоненты набора и образцы должны достичь комнатной температуры перед началом тестирования. Аккуратно перемешайте cut-off, отрицательный и положительный контроли и образцы перед началом анализа.
2. Определите общее количество образцов, которое необходимо протестировать. Кроме образцов сывороток, в каждую постановку необходимо включать: одну лунку для отрицательного контроля, одну лунку для положительного контроля и две лунки для контролей cut off
3. Достаньте микропланшет из алюминиевого пакета, для этого разрежьте один из его краев. Вставьте необходимое количество стрипов (в соответствии с количеством тестируемых образцов) в держатель. Неиспользуемые стрипы необходимо немедленно вернуть в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно зарыть, плотно закрутив разрезанный край и полностью заклеив его клейкой лентой.
4. Разведите концентрат промывочного буфера в соотношении 1:20 дважды деионизированной или дистиллированной водой. Например, для приготовления 1 литра промывочного буфера добавьте 50 мл концентрата к 950 мл дважды деионизированной или дистиллированной воды.

В. Инкубация образцов сыворотки и контролей

5. Разведите каждый образец сыворотки в соотношении 1:100 буфером для разведения образцов следующим образом: внесите 10 мкл сыворотки к 190 мкл буфера для разведения образцов (1/20), а затем разведите далее, добавив 25 мкл первого (1/20) разведения к 100 мкл буфера для разведения образцов.

- Внесите по 50 мкл IgA и/или IgM cut off контролей, отрицательного и положительного контролей, и разведенных в соотношении 1:100 образцов сывороток в соответствующие лунки стрипов.
- Заройте стрипы пленкой и инкубируйте при 37°C в течение 1 часа во влажной камере.
- Удалите жидкость из лунок.

9. **Промывка:**

Ручная промывка:

Наполните каждую лунку промывочным буфером и удалите жидкость, повторите процедуру 3 раза.

Автоматическая промывка:

Заполните каждую лунку по 350 мкл промывочного буфера и удалите жидкость, повторите этот шаг 3 раза.

- Высушите стрипы и держатель, аккуратно постукивая микропланшетом по фильтровальной бумаге.

C. Инкубация с конъюгатом

- Концентрат конъюгата HRP с антителами к IgA или IgM должен быть разведен до рабочего раствора непосредственно перед использованием. Разведите концентрат конъюгата в соотношении 1/300 буфером для разведения конъюгата. Например, для двух стрипов необходимо приготовить не менее 3 мл рабочего раствора конъюгата, следующим образом: 10 мкл концентрата конъюгата добавьте к 3 мл буфера для разведения конъюгата.
- Внесите по 50 мкл рабочего раствора конъюгата HRPв каждую лунку.
- Заройте стрипы пленкой и инкубируйте при 37°C в течение 1 часа во влажной камере.
- Удалите жидкость из лунок и промойте, как описано в п.п. 9-10.

D. Инкубация с субстратом ТМВ

- Внесите по 100 мкл субстрата ТМВ к каждую лунку, заройте стрипы пленкой и инкубируйте в течение **15 минут** при комнатной температуре.
- Остановите реакцию, внося по 100 мкл стоп-раствора (1M H₂SO₄) в каждую лунку.

E. Определение результатов

- Определите абсорбцию не позднее, чем через 30 минут после остановки реакции, при длине волны 450/620 нм и сохраните результаты.

• **Внимание:** Перед считыванием абсорбции убедитесь в отсутствии пузырей на поверхности жидкости в лунках. Дно микроплатшета должно быть тщательно высушено.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для того, чтобы результаты тестирования были признаны достоверными, необходимо выполнение следующих критериев. В случае, если какой-либо критерий не выполняется, анализ должен быть признан недействительным и должен быть повторен.

- ОП положительного контроля ≥ 1.0
- Отношение ОП положительного контроля / ОП cut off контроля > 2.0
- ОП отрицательного контроля: < 0.25

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Необходимо рассчитать среднее значение абсорбции для контроля Cut off, протестированного в дублях.
- Для стандартизации результатов, получаемых в различных постановках, необходимо рассчитать индекс cut off (COI), по следующей формуле:
- COI = Абсорбция образца сыворотки/среднее значение ОП контроля Cut off.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретация результатов, основанная на определении IgM и IgA классов антител

Абсорбция при 450 нм	COI	Результат	Интерпретация
ОП < СОС	<1.0	Отрицательный IgA и IgM антитела не определяются	Нет данных о присутствии инфекции <i>B.pertussis</i> (см. ограничения метода)
СОС \leq ОП \leq 1.1xСОС	1-1.1	Пограничная (серая) зона Необходимо повторно провести сбор образца сыворотки через 3-4 недели и протестировать (Если повторный анализ также даст пограничный результат, то образец должен быть признан отрицательным)	

ОП >1.1. x СОС	>1.1	Положительный Значительный уровень IgA и/или IgM антител	Указывает на текущую инфекцию <i>B.pertussis</i> .
----------------	------	---	--

Для получения полного профиля антител, необходимо протестировать образцы на IgM, IgA и IgG.

Интерпретация результатов, основанная на определении IgM, IgA и IgG классов антител.

Bordetella Pertussis			
IgG	IgM	IgA	
Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Нет данных о присутствии инфекции <i>B.pertussis</i> (см. ограничения метода)
Отрицательный или положительный	Положительный	Отрицательный или положительный	Указывает на текущую инфекцию
Отрицательный или положительный	Отрицательный	Положительный	Указывает на текущую инфекцию
Положительный	Отрицательный	Отрицательный	Указывает на недавнюю или прошедшую инфекцию или прошедшую иммунизацию

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Только результаты серологического анализа не могут служить основанием для постановки окончательного диагноза. Необходимо принимать во внимание все клинические и лабораторные данные.
- Образцы, взятые слишком рано при первичной инфекции могут не содержать определяемых антител. Если ожидается присутствие *B.pertussis*, необходимо повторно получить образец через 2-4 недели и провести параллельное тестирование обоих образцов.
- Если предполагается наличие инфекции у детей младше 6 месяцев, необходимо использовать другие методы (клеточные, ПЦР), так как у детей в возрасте до 6 месяцев редко вырабатываются антитела.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Воспроизводимость для IgA

Воспроизводимость внутри серии:

Образец	Кол-во повторов	Среднее значение ОП	CV%
Положительный	10	0.857	5.4
Отрицательный	10	0.225	5.1

Воспроизводимость между сериями:

Образец	Кол-во повторов	Среднее значение ОП	CV%
Положительный	10	0.911	5.6
Отрицательный	10	0.147	6.1

Воспроизводимость для IgM

Воспроизводимость внутри серии:

Образец	Кол-во повторов	Среднее значение ОП	CV%
Положительный	10	0.862	3.1
Отрицательный	10	0.280	2.4

Воспроизводимость между сериями:

Образец	Кол-во повторов	Среднее значение ОП	CV%
Положительный	10	0.906	5.7
Отрицательный	10	0.238	6.9



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