

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG, IgM, IgA К MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

### EIA-4250, EIA-4251, EIA-4252, Tuberculosis IgG/IgM/IgA ELISA

Каталог. № : EIA-4250, EIA-4251, EIA-4252

Количество : 96

Производитель: DRG (Германия)

Методика от 09-2010

Версия 3.0



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

#### 1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА антитела туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*) был разработан для обнаружения и количественного анализа специфических антител класса IgG/IgM/IgA в сыворотке и плазме к *Mycobacterium tuberculosis*. Дополнительные инструкции для других жидкостей организма предоставляются по запросу. Этот анализ предназначен только для диагностического использования *in vitro*. Все результаты лабораторного исследования должны интерпретироваться в сочетании с другими клиническими данными. Клиническая оценка дальнейших исследований должна дополнительно приниматься во внимание.

#### 3. ПРИНЦИП ИССЛЕДОВАНИЯ

Принцип реакции исследования может быть описан в четырех стадиях.

##### 1. Инкубация сыворотки

Специфические антитела связываются с антигенами в твердой фазе, образуя стабильный иммунный комплекс. После 60-минутной инкубации при комнатной температуре лунки промываются предварительно разбавленным промывочным буфером, чтобы удалить все неактивные серологические компоненты.

##### 2. Инкубация конъюгата

Конъюгат пероксидазы хрена анти-человеческого IgG/ -IgM/ -IgA добавляется во все лунки. Конъюгат связывается с IgG / IgM / IgA антителами антигена твердой фазы, формируя стабильный «сэндвич». После 30-минутной инкубации при комнатной температуре избыток конъюгата удаляется промыванием всех лунок промывочным буфером.

##### 3. Реакция субстрата и остановка

Субстрат ТМВ распределяется в каждую лунку и реакция пероксидазы фермента/субстрата реакция формирует стабильный хромоген синего цвета. Реакция, и впоследствии развитие цвета, останавливается после 20-минутной инкубации при комнатной температуре добавлением в лунку 0.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Изменение pH также заставляет хромоген изменить цвет из синего на желтый.

##### 4. Считывание и интерпретация

Интенсивность цвета считывается на микротитровальном планшет-ридере при 450 нм (рекомендуемая длина волны для бихроматического измерения: 600-690 нм). Интенсивность цвета (ОП) прямо пропорциональна концентрации специфического антитела в образце пациента.

#### 4. СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Наборы содержат достаточно реагентов для 12 x 8 = 96 определений. Стрипы и растворы должны храниться при 4 - 8°C. Срок годности указан на этикетках.

12	Микротитровальные стрипы	Отдельные стрипы, каждый содержащий 8 делимых лунок. Покрытых антигеном <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
1 x	Штатив рамки	
4 x 2 мл	Калибраторы 1 - 4	Человеческая сыворотка, содержащая антитела к <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (концентрации указаны ниже), разбавленная в PBS и стабилизированная 0.01 % метилизотиазолоном и 0.01 % бромонитродиоксаном в качестве консервантов, готовая к использованию.

		IgG	IgM	IgA
Кал. 1 (отрицательный)	Концентрация (Е/мл)	1	1	1
Кал. 2 (Cut-off)		10	10	10
Кал. 3 (слабо положительный)		40	30	30
Кал. 4 (положительный)		150	100	100

1 x 60 мл	Разбавитель сыворотки	Раствор буфера PBS/BSA, содержит < 0.1 % азиды натрия в качестве консерванта, готовый к использованию
1 x 12 мл	Раствор ферментного конъюгата	HRP-меченный козлий анти-человеческий IgG /-IgM /-IgA, готовый к использованию
1 x 12 мл	Субстрат ТМВ	3,3',5,5' тетраметилбензидин, готовый к использованию
1 x 12 мл	Стоп раствор	0.5 N серная кислота, готовая к использованию
1 x 60 мл	Промывочный буфер концентрированный 10 x	Раствор 10 x концентрированного буфера PBS/Tween, подлежащего разбавлению 1:10 перед использованием; концентрат необходимо подогревать до 37°C в течение 15 мин., чтобы устранить кристаллы
2 x	Пленки для планшета	Для накрывания микротитровальных стрипов в течение инкубации
1 x	Полиэтиленовый пакет	Запечатывающийся; для предохранения от влаги неиспользованных стрипов

#### 5. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микро- и многоканальные пипетки: 5, 100 и 500 мкл.
- Микротитровальный планшет-ридер с фильтром 450 нм (референсный фильтр: 600-690 нм).
- Микротитровальный планшет-вошер (в случае ручной промывки: промывочная бутылка).
- Пробирки реагентов для разбавления сыворотки.
- Мерная колба.
- Дистиллированная вода или вода высокой очистки.

## 6. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ЗАМЕЧАНИЯ

- Только для диагностического использования *in vitro!* В Соединенных Штатах этот набор предназначен для использования в исследовательских целях. Не глотать и не принимать вовнутрь. Необходимо следовать лабораторным мерам предосторожности. Запрещается есть, пить или курить в лаборатории.
- Все сыворотки, плазмы или исходные буферы были проверены на поверхностный антиген вируса гепатита В, ВИЧ и вирус гепатита С соответственно общепринятыми методами и оказались отрицательными. Однако, предосторожности подобно использованию латексных перчаток должны также соблюдаться.
- Разлитие сыворотки и реагента необходимо устранить дезинфицирующим раствором (например, гипохлоритом натрия 5 %) и должным образом должны быть утилизированы.
- Все реактивы должны быть приведены к комнатной температуре (от 18 до 24°C) перед проведением исследования.
- Перед пипетированием все реагенты должны быть смешаны полностью осторожным наклоном или покачиванием. Нужно избегать энергичного встряхивания с образованием пены.
- Важно пипетировать равными интервалами, чтобы все лунки микротитровального планшета находились в одинаковых условиях.
- При удалении реагентов из бутылок необходимо соблюдать осторожность, чтобы не загрязнить пробки. Какого либо дальнейшего смешивания нужно избегать. Содержимое бутылок обычно чувствительно к окислению, поэтому их следует открывать только на короткий промежуток времени.
- Чтобы избежать переноса или перекрестного загрязнения, необходимо использовать отдельные одноразовые наконечники.
- Не должны использоваться какие либо реагенты из разных партий наборов и не должны смешиваться друг с другом.
- Все реагенты должны использоваться в пределах срока годности.
- В соответствии с квалифицированной лабораторной практикой (GLP) или следуя ISO 9001, все лабораторные используемые лабораторные устройства должны регулярно проверяться на эффективность и точность. Это относится, например, к микропипеткам и промывочным или считывающим аппаратом (планшет-ридер ИФА).
- Необходимо избегать контакта некоторых реагентов, особенно стоп раствора и субстрат, с кожей, глазами и слизистыми оболочками, по причине возможного возникновения раздражений и кислотных ожогов, а также существования опасности интоксикации.

## 7. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Храните все реагенты при 4 - 8°C.

Срок годности каждого реагента указан на отдельных этикетках. Не используйте никакие реагенты по истечению срока годности. Разбавленный промывочный буфер стабилен до 4 недель если хранить при 4 - 8°C.

## 8. СБОР И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Для определения могут использоваться и сыворотка и плазма (ЭДТА, гепарин). Сыворотка после свертывания и центрифугирования отделяется от крови, которая собирается венепункцией асептическим способом. Образцы сыворотки или плазмы могут храниться при 4 - 8°C до 48 часов. При более длительном хранении они должны держаться при -20°C. Образцы не должны замораживаться и размораживаться неоднократно. Липемические, гемолитические или бактериально загрязненные образцы могут вызывать ошибочно положительные или ошибочно отрицательные результаты. Сыворотки пациентов должны предварительно разбавляться перед анализом 1:101 разбавителем сыворотки (например, 5 мкл сыворотки + 500 мкл разбавителя сыворотки) до испытания. Образцы, содержащие концентрации выше чем самый высокий калибратор, должны быть дальше разбавлены разбавителем сыворотки. В случае интерференции с ревматоидными факторами, рекомендуется преабсорбция сыворотки абсорбентом РФ (Код для заказа: 651003). Не абсорбируйте калибраторы.

## 9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

### 9.1 Подготовка реагентов

**Позвольте перед использованием всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (КТ, 18 - 24°C) и хорошо перемешайте.**

**Промывочный буфер:** Растворите любые кристаллы, которые могут быть в бутылке, нагревая до 37°C и затем хорошо смешайте.

Разбавьте концентрированный промывочный буфер 1:10 дистиллированной водой (например, 60 мл буферного концентрата + 540 мл дистиллированной воды). Тщательно перемешайте.

- Строго следуйте инструкциям для обеспечения надежного проведения исследования. Любые изменения полагаются на ответственность пользователя.
- Перед использованием все реактивы и образцы должны быть приведены к комнатной температуре, но не должно оставаться при этой температуре более длительное время чем необходимо.
- Калибровочная кривая должна быть установлена в каждом анализе.
- Положите неиспользованные микротитровальные стрипы обратно в полиэтиленовый пакет и храните в сухом месте при 4 - 8°C.

### 9.2 Этапы анализа

Приготовьте достаточное количество лунок на микротитровальном планшете для калибраторов, контролей и образцов.

**Внимание: Другие инкубационные условия могут быть возможны. В случае изменений рекомендуемой процедуры анализа (например, температуры инкубации 37°C вместо КТ) пользователь должен подтвердить эффективность анализа.**

1. Пипетируйте в соответствующие лунки по 100 мкл каждого разбавленного (1:101) образца и готовых к использованию калибраторов (100 мкл разбавителя сыворотки для лунки бланка).
2. Накройте планшет прилагаемой липкой пленкой и инкубируйте при комнатной температуре в течение 60 минут.
3. Удалите содержимое микролунок и промойте 3 раза 300 мкл разбавленного промывочного буфера. Впоследствии удалите остатки промывочного раствора легким постукиванием микротитровального планшета о бумажное полотенце.
4. Пипетируйте в каждую лунку по 100 мкл раствора ферментного конъюгата.
5. Накройте планшет липкой пленкой и инкубируйте при комнатной температуре в течение 30 минут.
6. Удалите содержимое микролунок и промойте 3 раза 300 мкл разбавленного промывочного буфера. Впоследствии удалите остатки промывочного раствора легким постукиванием микротитровального планшета о бумажное полотенце.
7. Распределите в каждую лунку по 100 мкл субстрата TMB.
8. Накройте планшет липкой пленкой и инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут.
9. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп раствора.
10. После тщательного смешения и вытирания дна планшета считайте оптическую плотность при 450 нм и вычислите результаты. Обнулите вхолостую. Рекомендуется бихроматическое измерение, используя референсную длину волны 600 – 690 нм.

**Развитый цвет стабилен по крайней мере 60 минут. Считайте в это время оптические плотности.**

## 10. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

### Пример

	ОП 450 нм	Исправленная ОП	Среднее значение ОП
Бланк	0.020		
Калибратор 1 (отриц.)	0.024/0.026	0.004/0.006	0.005
Калибратор 2 (cut-off)	0.520/0.580	0.500/0.560	0.530
Калибратор 3 (слабо полож.)	1.100/1.132	1.080/1.112	1.096
Калибратор 4 (полож.)	1.500/1.590	1.480/1.570	1.525

Таблица выше должна рассматриваться как пример, результаты которого были достигнуты при произвольной температуре и условиях окружающей среды. Эти данные не описывают **референсные значения**, которые должны быть определены в других лабораториях таким же образом!

### 10.1 Качественное вычисление

Рассчитанные значения ОП для сывороток пациентов как упомянуто выше сравнены со значением порогового (cut-off) калибратора. Если значение образца выше, тогда он должен считываться как положительный. Значение ниже порогового калибратора должно считываться как отрицательное. Целесообразно определить диапазон +/- 20 % от порогового значения как серую зону. Рекомендуется повторить результаты, находящиеся в пределах серой зоны, используя ту же самую сыворотку или новый образец того же самого пациента, собранный через 2 - 4 недели. Оба образца должны быть измерены параллельно в той же самой процедуре. Положительный калибратор должен показать по крайней мере двойное значение абсорбции от значения, полученного пороговым калибратором.

### 10.2 Количественное вычисление

Готовые к использованию калибраторы набора антител *Mycobacterium tuberculosis* определены и значения выражены в произвольных единицах (Е/мл). Это позволяет получить точный и воспроизводимый количественный анализ, и в последствии возможен мониторинг титра антител пациента. Значения концентрации калибраторов указаны на этикетках флаконов. Вводя среднее значение абсорбции калибраторов на Y-оси и соответствующие концентрации на X-оси с использованием миллиметровки изображает калибровочную кривую. Концентрация образцов пациентов может тогда считываться непосредственно с графика. Вычисление результата может проводится с использованием компьютера и подходящего программного обеспечения.

## 11. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНАЛИЗА

Характеристики ИФА ТУБЕРКУЛЕЗА IgG/IgM/IgA были установлены и оценены в соответствии с Европейской IVD Директивой. Детальные данные проверки правильности могут быть предоставлены по запросу.



### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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