

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ НАПІВКІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО ЛИХОМАНКИ ДЕНГЕ В ЛЮДСЬКІЙ СИРОВАТЦІ АБО ПЛАЗМІ

### 8116-35, Dengue IgG ELISA

Каталог. №: 8116-35

Методика від 09-18-2013

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

#### ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Кількість тестів	96 тестів
Тест	Dengue IgG ELISA
Метод	Імуносорбентний аналіз ІФА
Принцип	ІФА – непрямий; планшет, покритий антигеном
Діапазон визначення	Напівкількісний: Позитивний, Негативний
Зразок	10 мкл
Специфічність	97.4 %
Чутливість	94.7 %
Загальний час	~ 15 хвилин
Термін придатності	12 місяців від дати виробництва

#### ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір DAI Dengue IgG ELISA є напівкількісним імуноферментним тестом для виявлення антитіл до лихоманки Денге в зразках сироватки або плазми людини. Цей тест призначений тільки для використання кваліфікованим персоналом.

#### РЕЗЮМЕ І ОПИС (Див. оригінал інструкції).

#### ПРИНЦИП ТЕСТУ

Лунки покривають очищеним антигеном вірусу Лихоманки Денге з культур клітин типу 1-4 Денге. Під час першої інкубації з розведеними зразками сироватки пацієнта, будь-які антитіла, які взаємодіють з антигеном, зв'язуються з покритими лунками. Після промивання для видалення залишків зразка, додається кон'югат. Якщо антитіла зв'язалися з лунками, то ферментний кон'югат зв'яжеться з цими антитілами. Після другої промивки додається Хромоген (Тетраметилбензидин або ТМБ). Якщо Ферментний Кон'югат присутній, пероксидаза каталізує реакцію, яка поглинає перекис і змінює колір хромогену на синій. Додавання Стоп-розчину зупиняє реакцію і перетворює синій колір в яскраво-жовтий. Реакція може бути зчитана візуально або за допомогою ELISA читача.

#### ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Сироватка або плазма можуть зберігатися при температурі 2-8 °С протягом п'яти днів. Зразки можуть бути заморожені при температурі нижче -20 °С протягом тривалих періодів часу. Заморожування зразків цільної крові не рекомендується. Не нагрівати інактивовані зразки і уникати повторного заморожування і відтавання зразків.

Одиничні екземпляри використовуються для оцінки впливу; два зразки, зібрані в різний час від того самого пацієнта, використовуються, щоб показати сероконверсію. Парні зразки повинні бути аналізовані одночасно. Рекомендується проводити забір зразків в одужуючого пацієнта, що показують або початковий неактивний результат або слабо реактивний результат. Завдяки високій перехресній реактивності з іншими флавівірусами, тест IgM також рекомендується.

#### КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

##### Матеріали, що поставляються з набором

- Планшет:** мікролунки, що містять антигени Денге (серотип 1-4) - 96 лунок в Тримачі для смужок.
- Ферментний кон'югат:** один (1) флакон 11 мл анти-людського IgG (специфічний γ-ланцюжок), кон'югованого з пероксидазою.
- Позитивний контроль:** Один (1) флакон, що містить 1 мл розведеної позитивної сироватки людини.

- Негативний контроль:** Один (1) флакон, що містить 1 мл розведеної негативної сироватки людини.
- Хромоген:** Один (1) флакон, що містить 11 мл Хромогену тетраметилбензидину (ТМБ).
- Промивний концентрат 20x:** Один (1) флакон, що містить 25 мл концентрованого буфера і сурфактанта.
- Буфер для розведення:** два (2) флакони, що містять 30 мл буферного розчину протеїну.
- Стоп-розчин:** 1 (один) флакон з 11 мл 1М фосфорної кислоти.

##### Матеріали, необхідні, але не надані

- Мікропіпетки
- Гнучка пляшка для промивання смужок (рекомендується з вузьким наконечником)
- Хімічно чиста (DI) вода
- Мірний циліндр
- Пробірки для розведення зразків
- Фільтрувальний папір
- ELISA рідер з фільтром 450 нм і 620-650 нм (опційно, якщо результати можна побачити наочно)

##### Належна температура

Всі інкубації проводяться при кімнатній температурі (15-25 °С).

##### Підготовка

- Перед використанням привести всі реагенти та зразки до кімнатної температури (15-25 °С) і перемішати.
- Промивний концентрат (20x) може дати осад при зберіганні в холодильнику, але перейде знову в рідкий стан, коли досягне кімнатної температури і буде перемішаний. Переконайтеся, що Промивний концентрат (20x) повністю в рідкому стані перед розведенням до робочої концентрації. Для розведення (20x) промивного концентрату для робочого розведення зніміть ковпачок і додайте вміст однієї пляшки промивального концентрату до гнучкої пляшки, що містить 475 мл дистильованої води. Перемішати. Пластикові пляшки повинні мати вузький наконечник для оптимізації промивки.

##### ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

###### Примітки:

- Переконайтеся, що всі зразки і реагенти при кімнатній температурі (15-25 °С).
- При виконанні аналізу постарайтеся уникнути утворення повітряних бульбашок в лунках. Бульбашки можуть вплинути на загальну продуктивність аналізу і зчитування кінцевих результатів. Постукування планшетою по чистому абсорбуючому паперу після кожного кроку повинно допомогти звести до мінімуму утворення бульбашок в лунках.
- Негативний і позитивний контрольи поставляються попередньо розведеними. НЕ ПОТРЕБУЮТЬ подальшого розведення.

- Приготувати необхідну кількість лунок (дві для контролів плюс кількість зразків) і помістити в тримач.
- Розвести сироватки пацієнта 1:40 з використанням буфера для розведення зразків (наприклад, 10 мкл сироватки і 390 мкл буфера для розведення).
- Додати **100 мкл** негативного контролю у лунку №1, **100 мкл** позитивного контролю в лунку №2 і по **100 мкл** розведених зразків в решту лунок.
- Інкубувати при кімнатній температурі протягом 5 хвилин, потім промити\*. Після останньої стадії промивки, ляпас свердловин на чисту вбирає рушник, щоб видалити зайву промивального буфера.
- Додати **100 мкл** ферментного кон'югату в кожен лунку.
- Витримайте при кімнатній температурі протягом 5 хвилин, потім промити\*. Після останньої стадії промивки, постукайте планшетою по чистому абсорбуючому паперу, щоб видалити залишки промивного буфера.
- Додати **100 мкл** розчину хромогену в кожен лунку.
- Інкубувати при кімнатній температурі протягом **5 хвилин**.
- Додати **100 мкл** стоп-розчину в кожен лунку. Змішати акуратним постукуванням збоку тримача вказівним пальцем протягом приблизно **15 секунд**.
- Зчитати протягом однієї години після додавання стоп-розчину.

\*Промивання складається з активного заповнення кожної лунки до країв і декантування вмісту 3 (три) рази. Коли це можливо, уникнути утворення бульбашок в лунках, тому що це може вплинути на кінцевий результат.

##### РЕЗУЛЬТАТИ

**Наочно:** Подивитися на кожен лунку на білому фоні (наприклад, на фоні паперового рушника) і записати результати як прозорий або +, ++ чи +++ реакція.

**ELISA Рідер:** Обнулити рідер. Встановити для біхроматичний зчитувань при 450/620-650 нм.

#### Пошук і усунення несправностей

Негативний контроль має надмірний розвиток кольору.

**Причина:** Некоректні промивки.

**Усунення:** Промити більш енергійно. Видалити надлишки рідини з лунок на промокальній папір. Не допускати висихання лунок.

#### Інтерпретація випробувань

**Завідомо нереактивні:** Зразки, що інтерпретуються як не реактивні (0.0-0.15 одиниць ОЩ, або відсутність чи дуже слабке забарвлення), вказують на те, що у збірці немає антитіла. Оскільки антитіла можуть бути відсутніми на початку захворювання, (5-8 днів інкубації), необхідно провести підтвердження через 2-3 тижні потому для лабораторної діагностики. У цей час, пацієнти, що мають слабку реакцію (0.15-1.0 або +, ++), мають додатково пройти перевірку альтернативними методами або бути повторно протестованими через 10-14 днів. Зразки пацієнтів на стадії одужання із значною реакцією (> 1.0 OD) вказують на утворення специфічних антитіл проти флавівірусу. Завідомо негативний результат з подальшим позитивним результатом вказує на сероконверсію.

**Завідомо слабо реактивні:** Слабо реактивні зразки інтерпретувати з обережністю. У нормальних популяцій, слабо реактивні зразки є нечастими, але можливими. Рекомендується підтвердження з використанням зразків, отриманих через 2-3 тижні (парні сироватки в гострій формі і в формі одужання). ОЩ, > 1.0 у другому зразку підтверджує наявність нещодавніх специфічних антитіл. [Застереження: якщо це є перехресно-реактивне антитіло, зразки сироватки в одужуючій формі не можуть показати більш високий рівень антитіл, ніж зразки в гострій формі.] Якщо результати зчитування залишаються на рівні 0.15-1.0 OD, або +, ++, слід розглянути іншу методику (IgM), або зразок може бути інтерпретований як отриманий за межею підвищення титру (титр знижується).

**Завідомо Реактивні:** Зразки, які інтерпретуються як сильно реактивні (> 1.0 ОЩ або +++), можуть вказувати на наявність специфічних антитіл. Присутність антитіл сама по собі не може бути використана для діагностики гострої інфекції, тому що антитіла з попереднього захворювання можуть циркулювати протягом тривалого періоду часу.

#### ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Кількість позитивних осіб в популяції залежить від двох факторів: поширеності хвороб та клінічних критеріїв, які використовуються для вибору тестової популяції. У зв'язку з тим, що дуже небагато позитивних результатів повинно спостерігатися у випадково відібраного населення в неендемичній області, більшість серологічних тестів не є досить конкретними, щоб проводити скринінг неендемичного населення. Навіть в ендемічних районах, серологічний скринінг часто дає багато помилкових позитивних результатів, якщо використовується для випадкового скринінгу пацієнтів. Серологічні тести корисні для тестування пацієнтів в ендемічних районах з ознаками та симптомами відповідно із захворюванням.

Рівень антитіл, як правило, є низьким або відсутній на етапі ранньої інфекції. Симптоматичні пацієнти можуть не мати антитіл протягом перших 1-2 тижнів після захворювання і титр антитіл буде рости з часом.

#### КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Використання контролів дозволяє оцінити стабільність набору. Комплект не слід використовувати, якщо будь-які значення контролей знаходяться поза діапазоном.

#### Очікувані значення для контролів:

**Негативні** – 0.0 – 0.15 одиниць ОЩ

**Позитивні** – 0.5 одиниць ОЩ і вище

#### РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

		Reference Method *	
		+	-
Diagnostic Automation, Inc.	+	18	2
	-	1	75

Позитивна Узгодженість: 94.7% (18/19)

Негативна Узгодженість: 97.4% (75/77)

\*Контрольний Метод відноситься до комерційно доступного ELISA.

#### ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Діагностика інфекції Денге не повинна бути зроблена тільки на підставі результатів даного тесту, але в поєднанні з іншими клінічними ознаками і симптомами і результатами інших лабораторних досліджень.

Епідеміологічні фактори, клінічні дані, вплив в ендемічних регіонах, а також інші лабораторні результати повинні враховуватися при постановці діагнозу.

Відомі перехресні реакції між антигенами Денге необхідно враховувати при інтерпретації, так як деякі епітопи, як відомо, реагують з іншими флавівірусами. Тестування IgM допоможе відрізнити перехресно-реактивні зразки.

У зв'язку з тим, що серологічні методи аналізу можуть призводити до різних результатів для слабо реактивних зразків, рекомендується використати інший серологічний метод (тобто альтернативний метод, який окремо визначає IgM і IgG антитіла).

#### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Не відхилятися від зазначених процедур при виконанні даного аналізу. Всі розведення зразка, час інкубації/ температури і промивка були оптимізовані для кращих характеристик роботи. Відхилення від зазначених процедур можуть впливати на чутливість і специфічність аналізу.
2. Для діагностичного In-Vitro використання.
3. Не використовувати реагенти з різних наборів.
4. Не використовувати реагенти, у яких закінчився термін придатності. Строк придатності вказаний на кожній етикетці реагенту. Використання реагентів після закінчення терміну їх дії може вплинути на результати.
5. Невикористані лунки слід зберігати з осушувачем, щоб захистити їх від вологи.
6. Не використовуйте розчини, якщо вони випадають в осад або стають мутними.  
**Виняток:** Промивний концентрат може випадати в осад при зберіганні в холодильнику, але розчиняється після нагрівання.
7. Не слід додавати азида в зразки або реагенти.
8. Контролі і деякі реагенти містять тимеросал в якості консерванту, який може викликати роздратування шкіри, очей і слизових оболонок. У разі потрапляння, промийте очі або шкіру великою кількістю води.
9. Не рекомендується використовувати сироватку із зростанням мікробів або ж каламутну через високий вміст ліпідів. Зразки з високим вмістом ліпідів необхідно очистити перед використанням.
10. Поводитись з усіма зразками як з потенційно інфекційними матеріалами. Позитивний контроль був протестований і визначений як негативний до поверхневого антигену вірусу гепатиту В та на антитіла до ВІЛ. Дотримуйтеся обережності, щоб запобігти утворенню аерозолів, та знезаражуйте будь-яке розбризкування зразків.
11. Стоп розчин є 5% розчином фосфорної кислоти у воді. При попаданні на шкіру, промити великою кількістю води. Якщо кислота потрапляє в очі промийте їх великою кількістю води і звернутися до лікаря.

#### Умови зберігання

1. Реагенти, смужки і компоненти в пляшках зберігати при температурі 2-8 °С.
2. Гнучка пляшка з розведеним промивальним буфером може зберігатися при кімнатній температурі (15-25 °С).



#### ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул.Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 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)