

# ДІАГНОСТИЧНИЙ НАБІР ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ IgG ЛЮДИНИ ДО BORDETELLA PERTUSSIS

## DEBPT01, Bordetella pertussis IgG ELISA

Кат. № : DEBPT01  
Виробник : DEMEDITEC (Німеччина)

Версія 7b  
Оновлено 30-07-2018



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

### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Діагностичний набір ІФА Bordetella pertussis IgG був розроблений для виявлення та кількісного визначення специфічних IgG антитіл проти Bordetella pertussis в сироватці та плазмі. Подальші застосування в інших рідинах тіла можливі і можуть бути запрошені в технічній службі DEMEDITEC.

Результати лабораторних досліджень ніколи не можуть бути єдиною базою медичного висновку. Додатково слід враховувати історію хвороби та подальші випробування.

### 2. КОРОТКЕ ВИКЛАДЕННЯ ТА ПОЯСНЕННЯ МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ

Коклюш - це захворювання дихальних шляхів, яке викликається бактеріями Bordetella pertussis. Він передається повітряно-крапельним шляхом. Грамнегативний Ssacobacillus виробляє ряд біологічно активних молекул. Різні сполуки з'являються або під час патогенезу, або під час процесу імунізації проти коклюшу і проявляють різні ефекти. Характеристики були зроблені для токсину коклюша (pt), геммаглютиніну (fha) і різних ліпополісахаридів (lps).

Коклюш показує високу частоту передачі (рівень інфікування більше 90% виявлено для невакцинованих членів домогосподарства) і може викликати важкі захворювання, особливо для дуже маленьких дітей. З 10749 пацієнтів до одного року між 1980 і 1989 роками 69% були доставлені в лікарню, 22% страждали від пневмонії, 0,9% мали енцефалопатію і 0,6% померли.

Для дітей старшого віку та дорослих (включаючи вже вакцинованих) інфекція може спостерігатися неспецифічним бронхітом або запаленням верхніх дихальних шляхів. Навіть безсимптомні випадки досить поширені. Серологічну відповідь після хвороби кашлюку або імунізації вакциною коклюшу вимірювали за допомогою аглютинаційних аналізів, преципітатів, фіксації комплекменту та імуноферментного аналізу (ELISA). Імуноферментні аналізи, в яких антиген Bordetella (що містить токсин, FHA і LPS і стандартизований в Од/мл), пов'язані з твердофазним носієм, є чутливими, легкими у виконанні і можуть бути використані для визначення серопозитивності за допомогою однієї сироватки і для позначення недавньої інфекції Bordetella шляхом визначення IgM і IgA.

### 3. ПРИНЦИП АНАЛІЗІВ

Набір для визначення антитіл IgG до Bordetella pertussis заснований на принципі імуноферментного аналізу (EIA). Антиген Bordetella пов'язаний на поверхні мікротитрувальних смужок. Розведenu сироватку пацієнта або готові до використання стандарти піпетують в лунки мікротитрувального планшета. Здійснюється зв'язування між антитілами IgG сироватки і іммобілізованим антигеном Bordetella. Після однієї години інкубації при кімнатній температурі планшет промивають розведеним миючим розчином, щоб видалити незв'язаний матеріал. Потім додають готовий до використання кон'югат пероксидази та анти-людського IgG і інкубують протягом 30 хвилин. Після подальшої стадії промивки піпетують розчин субстрату (ТМБ) і інкубують протягом 20 хвилин, викликаючи розвиток синього барвника в лунках. Розвиток кольору припиняється додаванням стоп-розчину, який змінює колір з синього на жовтий. Отриманий барвник вимірюють спектрофотометрично на довжині хвилі 450 нм. Концентрація антитіл IgG прямо пропорційна інтенсивності кольору.

### 4. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

- Тільки для використання in vitro! Не вживати або ковтати! Необхідно дотримуватися звичайних лабораторних заходів безпеки, а також заборони їсти, пити та курити в лабораторії.

- Всі сироватки та плазми або буфери, засновані на них, були випробувані на HBsAg, ВІЛ та HCV з визнаними методами і були визнані негативними. Тим не менш, необхідно вжити заходів, таких як використання латексних рукавичок.
- Розливи сироватки і реагенту необхідно витирати з допомогою дезінфікуючого розчину (наприклад, гіпохлориту натрію, 5%) і правильно утилізувати.
- Перед проведенням випробування всі реактиви необхідно довести до кімнатної температури (від 18 до 25 °C).
- Перед піпетуванням всі реактиви необхідно ретельно перемішати, обережно нахиливши або перевертаючи. Слід уникати енергійного струшування з утворенням піни.
- Важливим є піпетування з постійними інтервалами, так що всі лунки мікротитрувального планшета мають однакові умови.
- При видаленні реагентів з пляшок необхідно стежити за тим, щоб пробки не були забруднені. Крім того, слід уникати можливого змішування. Вміст пляшок зазвичай чутливий до окислення, так що вони повинні бути відкриті тільки на короткий час.
- Щоб уникнути перенесення або перехресного забруднення, необхідно використовувати окремі наконечники для одноразових піпеток.
- Всі реактиви повинні використовуватися протягом терміну придатності.
- Відповідно до належної лабораторної практики (GLP) або відповідно до стандарту ISO9001, всі лабораторні пристрої повинні регулярно перевірятися щодо точності. Це стосується, серед інших, мікротитрувальних піпеток і промивача або зчитувача (ELISA-Reader).
- Необхідно уникати контакту левних реагентів, насамперед стоп-розчину та субстрату зі шкірою, очима і слизовою оболонкою, оскільки можуть виникнути можливі подразнення і кислотні опіки, і існує небезпека інтоксикації.

### 5. РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

Символ	Компоненти	Об'єм/ Кількість
SORB MT	Мікротитраційні смужки з нанесеним антигеном Bordetella pertussis	12
CAL A	Калібратор А (Негативний Контроль)	2 мл
CAL B	Калібратор В (Cut-off Стандарт)	2 мл
CAL C	Калібратор С (Слабкий Позитивний Контроль)	2 мл
CAL D	Калібратор D (Позитивний Контроль)	2 мл
ENZ CONJ	Ферментний Кон'югат	15 мл
SUB TMB	Субстрат	15 мл
STOP SOLN	Стоп-Розчин	15 мл
SAM DIL	Розчинник Зразка	60 мл
WASH SOLN 10x	Промивний Буфер (10x)	60 мл

**Зберігання та стабільність** (зверніться до терміну придатності на етикетці зовнішньої коробки)

Зберігайте компоненти набору при температурі 2-8 °C і не використовуйте їх після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішній етикетці. Перед використанням всі компоненти слід нагріти до температури навколишнього середовища (18-25 °C). Після використання пластину слід герметизувати, щільно закрити пляшки, а набір зберігати при температурі 2-8 °C. Після першого відкриття набір слід використати протягом 3 місяців, розведений промивний буфер можна зберігати протягом 4 тижнів при температурі 2-8 °C.

#### 5.1. Мікротитраційні смужки

12 смужок з 8 відірваними лунками, кожна з яких покрита антигеном Bordetella pertussis (повний бактеріальний антиген, штам Tohamata). Готові до використання.

#### 5.2. Калібратор А (Негативний Контроль)

2 мл, розчин білка, розведений PBS, не містить антитіл IgG проти Bordetella. Додано 0,01% метилізотиазолону і 0,01% бромонітродіоксану. Готовий до використання.

#### 5.3. Калібратор В (Cut-off Стандарт)

2 мл, сироватка людини, розведена PBS, містить низьку концентрацію антитіл IgG проти Bordetella. Додано 0,01% метилізотиазолону і 0,01% бромонітродіоксану. Готовий до використання.

#### 5.4. Калібратор С (Слабкий Позитивний Контроль)

2 мл, сироватка людини, розведена PBS, містить середню концентрацію антитіл IgG проти Bordetella. Додано 0,01% метилізотиазолону і 0,01% бромонітродіоксану. Готовий до використання.

### 5.5. Калібратор D (Позитивний Контроль)

2 мл, сироватка людини, розведена PBS, містить високу концентрацію антитіл IgG проти Bordetella. Додано 0,01% метилізоіазолону і 0,01% бромонітродіоксану. Готовий до використання.

### 5.6. Ферментний кон'югат

15 мл, анти-людський IgG-HRP (кролик), в білковому буферному розчині. Додано 0,01% метилізоіазолону і 0,01% бромонітродіоксану і 5 мг/л Proclin™. Готовий до використання.

### 5.7. Субстрат

15 мл, ТМБ (тетраметилбензидин). Готовий до використання.

### 5.8. Стоп-розчин

15 мл, 1 N кислий розчин. Готовий до використання.

### 5.9. Розчинник зразка

60 мл, буфер PBS/BSA. Додано 0,095% азиду натрію. Готовий до використання.

### 5.10. Промивний буфер

60 мл, PBS + Tween 20, 10x концентрат. Кінцева концентрація: розвести 1+9 деіонізованою водою. Якщо під час зберігання в холоді кристали випадають в осад, концентрат необхідно підігріти при 37 °C протягом 15 хвилин.

## 6. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Мікро- і багатоканальні піпетки на 5 мкл, 100 мкл і 500 мкл
- Зчитувач мікропланшетів (450 нм)
- Мікропланшетний вошер
- Реагентні пробірки для розведення сироватки
- Деіонізована вода
- Чорна кришка для повторного використання для покриття (доступна за запитом у Demeditec Diagnostics GmbH)
- Пластиковий мішок

## 7. ЗБІР І ОБРОБКА ЗРАЗКІВ

Принципово для визначення використовувати сироватку або плазму (EDTA, гепарин). Сироватку відокремлюють від крові, яку асептично отримують венепункцією, після згортання і центрифугування. Зразки сироватки або плазми можна зберігати в охолоджену стані (2-8 °C) до 7 днів. Для тривалого зберігання їх слід зберігати при температурі -20 °C. Зразки не слід заморозувати і розморозувати повторно. Ліпемічні, гемолітичні або бактеріально забруднені зразки можуть викликати хибно позитивні або хибно негативні результати. Для проведення тестування зразки (не стандарти) розбавляють 1:101 з готовим до використання розчинником (наприклад, 5 мкл сироватки + 500 мкл розчинника зразка).

## 8. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

### 8.1. Підготовка реагентів

**Промивний Розчин:** розбавити перед використанням 1+ 9 деіонізованою водою. Якщо під час зберігання в холоді кристали випадають в осад, концентрат необхідно підігріти при 37 °C протягом 15 хвилин.

- Для надійної роботи рекомендується дотримуватися суворого протоколу. Будь-які зміни або модифікації є відповідальністю користувача.
- Всі реактиви та зразки повинні бути приведені до кімнатної температури перед використанням, але не повинні залишатися при цій температурі довше, ніж необхідно.
- З кожним аналізом слід побудувати стандартну криву.
- Поверніть невикористані мікротитрувальні смужки в пластиковий мішок і зберігайте їх сухими при температурі 2-8 °C.

### 8.2. Кроки аналізу

1. Приготуйте достатню кількість мікротитраційних лунок для стандартів, контролів та зразків, а також для бланка субстрату.
2. Піпетуйте по 100 мкл кожного з **розведених** (1:101) зразків і **готових до використання** стандартів і контролів відповідно в лунки. Залиште одну лунку порожньою для бланка субстрату.
3. Накрийте пластину кришкою та інкубуйте при кімнатній температурі протягом 60 хвилин.
4. Видаліть вміст лунок планшета (промийте або аспіруйте) і додайте 300 мкл розведеного промивного розчину. Цю процедуру повторюють три рази. Потім залишки промивного буфера видаляються обережним постукуванням мікротитрувального планшета на тканину.
5. Піпетуйте по 100 мкл в кожен лунку готового до використання субстрату. Залиште одну лунку порожньою для бланка субстрату.
6. Накрийте пластину кришкою та інкубуйте при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.
7. Видаліть вміст лунок планшета (промийте або аспіруйте) і додайте

300 мкл розведеного промивного розчину. Цю процедуру повторюють три рази. Потім залишки промивного буфера видаляються обережним постукуванням мікротитрувального планшета на тканину.

8. Піпетуйте по 100 мкл в кожен лунку готового до використання субстрату. Цього разу також заповнюється лунка для бланка субстрату.
9. Накрийте пластину кришкою і інкубуйте при кімнатній температурі протягом 20 хвилин в темряві (наприклад, в ящику).
10. Для припинення реакції субстрату піпетуйте по 100 мкл в кожен лунку готового до використання стоп-розчину. Піпетуйте також в лунку для бланка субстрату.
11. Після ретельного перемішування і витирання дна пластини виконайте зчитування поглинання при 450 нм (опційна референсна довжина хвилі 620 нм). Колір стабільний протягом принаймні 60 хвилин.

## 9. ОЦІНКА

### Приклад

	Значення ОЩ	Коригована ОЩ
Бланк Субстрату	0.006	
Негативний Контроль	0.196	0.190
Cut-off Стандарт	0.439	0.433
Слабкий Позитивний Контроль	0.908	0.902
Позитивний Контроль	2.504	2.498

Наведена вище таблиця містить лише приклад, який був отриманий при довільній температурі та умовах навколишнього середовища. Описані дані, таким чином, не містять контрольних значень, які повинні бути знайдені в інших лабораторіях однаково чином.

### 9.1. Якісна оцінка

Розраховані абсорбції для сироваток пацієнта, як згадано вище, порівнюються зі значенням для Cut-off стандарту. Якщо значення зразка вище, це позитивний результат. При значенні нижче Cut-off стандарту це негативний результат. Виглядає доцільним визначити діапазон +/- 20% навколо значення Cut-off як сіру зону. У такому випадку рекомендується повторити тест з тією самою сироваткою або з новим зразком того ж самого пацієнта, який буде отриманий через 2-4 тижні. Обидва зразка повинні вимірюватися паралельно в одному і тому ж аналізі. Позитивний контроль повинен показувати принаймні подвійну абсорбцію порівняно з Cut-off стандартом.

### 9.2. Кількісна оцінка

Готові до використання стандарти і контролі набору визначені і виражені в довільних одиницях (Од/мл). Це призводить до точної та відтворюваної кількісної оцінки. Отже, для даного пацієнта стає можливим подальший контроль. Значення контролів та стандартів в одиницях друкуються в паспорті даних КЯ.

Для кількісної оцінки абсорбції стандартів та контролів графічно наносяться проти їх концентрацій від точки до точки. З отриманої контрольної кривої значення концентрації для кожного зразка пацієнта потім можуть бути отримані відповідно до їх абсорбції. Також можна використовувати автоматичні комп'ютерні програми. Вибирається крива *точка-точка*.

Калібратор В з концентрацією 10 Од/мл служить Cut-off стандартом. Аналогічний якісній оцінці діапазон +/- 20% навколо Cut-off визначається як сіра зона. Таким чином, результати між 8 і 12 Од/мл повідомляються як граничні.

Для сумнівних позитивних результатів IgG і для підтвердження позитивних реакцій абсорбцію ревматоїдного фактора слід визначити за допомогою відповідного реагенту (кат. № DEMJS02, RF-адсорбент).

## 10. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Bordetella pertussis ІФА	IgG
Точність в аналізі	5.0 %
Точність між аналізами	4.3 %
Точність між лотами	2.6 - 4.5 %
Аналітична чутливість	0.98 Од/мл
Відновлення	106 - 114 %
Лінійність	78 - 124 %
Перехресна реактивність	Відсутність перехресної реактивності до RSV, аденовірусу та IgG парагрипу
Інтерференції	Немає інтерференції з білірубіном до 0.3 мг/мл, гемоглобіном до 8.0 мг/мл і

	тригліцидами до 5.0 мг/мл
Клінічна специфічність	84 %
Клінічна чутливість	100 %

#### 11. СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Chodorowska, M. et al. ELISA test used for serologic diagnosis of Pertussis. Med. Dosw. Microbiol., **48**: 15 (1996).
2. Finger, H. et al. Serological diagnosis of whooping cough. Dev. Biol. Stand., **610**: 331 (1985).
3. Granström, G. et al. Specific Immunoglobulin A to bordetella pertussis antigen. J. Clin. Microbiol. **26**: 869 (1988).
4. Kuno-Sakai, H. et al.: A simple and sensitive ELISA of antibodies to Pertussis antigens. Vaccine **10**: 350 (1992).
5. Nagel, J. et al.: Improved serodiagnosis of whooping cough caused by Bordetella pertussis. Dev. Biol. Stand. **610**: 325 (1985).
6. Reizenstein, E. et al.: Comparison of five calculation modes for antibody ELISA against Pertussis. J. Immunol. Methods **183**: 279 (1995).
7. Sato, Y. et al.: An improved ELISA system for the measurement of IgG antibodies against pertussis. Dev. Biol. Stand. **73**: 167 (1991).
8. Steketee, R. W. et al.: A comparison of laboratory and clinical methods for diagnosing pertussis. J. Infect. Dis. **157**: 441 (1988).



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)

