

## НАБІР РЕАГЕНТІВ

# КОКЛЮШ IgG ELISA

### ***Bordetella pertussis/toxin IgG***

Каталог. №: **EIA-3450**

Дата випуску інструкції: **2016/10**  
Версія **14.0**



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

## 1. ВСТУП

### 1.1 Призначення

Набір **DRG Коклюш IgG ELISA** містить матеріали для **якісного та напівкількісного** визначення антитіл класу IgG до токсину *Bordetella pertussis* та *Bordetella pertussis* у сироватці та плазмі (EDTA, літій-гепарин або цитратна плазма).

**Цей аналіз призначений тільки для діагностики in vitro.**

### 1.2 Короткий опис та пояснення

Види коклюшу - це неспоруотворюючі інкапсульовані біполярні, коккоподібні (блідо-забарвлені) грамнегативні палички (товщиною близько 0,3-0,5 мкм і довжиною 1 мкм). Рід складається з паразитів людини *B. pertussis* та *B. parapertussis* та *B. bronchiseptica*, які викликають ензоотичні інфекції у різних видів диких та домашніх тварин.

Коклюш викликає у людини синдром єдиного захворювання, відомий як коклюш або судомий кашель. Це дуже заразне дитяче захворювання (приблизно 80% випадків трапляється у віці до 5 років), яке передається при респіраторному контакті і пов'язане з високим рівнем смертності (приблизно 1 - 2% на першому році життя, пізніше приблизно на 1%).

За відсутності імунізації коклюш практично не лікується. Після клінічного коклюшу слідує природний набутий імунітет, який є тривалим, але не постійним. Поширення захворювання по всьому світу, хоча чітко змінене імунізацією та іншими погано визначеними соціальними, економічними та харчовими факторами. У більшості країн рекомендується активна вакцинація. Зазвичай препарат для імунізації поєднують з анатоксинами проти дифтерії та правця.

## 2. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір **DRG Коклюш IgG ELISA** - це твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA).

Мікротитрові лунки у вигляді твердої фази покриті антигеном токсину *Bordetella pertussis* та *Bordetella pertussis*. **Розведені зразки пацієнтів і готові до використання контролі** піпетуються у ці лунки. Під час інкубації специфічні до токсинів антитіла *Bordetella pertussis* та *Bordetella pertussis* позитивних зразків та контролю зв'язуються з іммобілізованими антигенами.

Після етапу промивання для видалення незв'язаного зразка та контрольного матеріалу, у лунки додають кон'юговані антитіла IgG проти людини з пероксидазою хрому. Під час другої інкубації цей кон'югат анти-IgG специфічно зв'язується з антитілами IgG, що призводить до утворення ферментозв'язаних імуних комплексів.

Після другого етапу промивання для видалення незв'язаного кон'югату утворилися імуні комплекси (у разі позитивних результатів) виявляються шляхом інкубації з ТМБ-субстратом та розвитком синього кольору. Синій колір перетворюється в жовтий, припиняючи реакцію ферментативного індикатора за допомогою сірчаної кислоти. Інтенсивність цього кольору прямо пропорційна кількості токсин-специфічного антитіла IgG до *Bordetella pertussis* та *Bordetella pertussis* Антитіла у зразку пацієнта. Поглинання при 450 нм зчитується за допомогою зчитувача мікротитрових планшетів ELISA.

## 3. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Цей набір призначений тільки для діагностики in vitro. Тільки для професійного використання.
- Перед початком аналізу, повністю та уважно прочитайте інструкцію. Використовуйте тільки дійсну версію інструкції-вкладиша, яка постачається з набором. Переконайтеся, що все зрозуміло.
- Всі реагенти цього тест-набору, які містять людську сироватку або плазму, були протестовані і виявлені негативними до ВІЛ I/II, HbsAg та HCV за допомогою схвалених FDA процедур. Проте, всі реагенти слід розглядати як потенційно небезпечні під час використання та утилізації.
- Уникайте контакту зі Стоп Розчином, який містить 0.2 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Це може викликати подразнення шкіри або опіки.

- ТМБ субстрат має подразнюючу дію на шкіру та слизову. У випадку попадання в очі, промийте достатньою кількістю води, а шкіру промийте з милом та великою кількістю води. Промийте забруднені об'єкти перед повторним використанням. При вдиханні - виведіть людину на свіже повітря.
- Мікропланшет містить відривні смужки. Не використані лунки потрібно зберігати при температурі від 2°C до 8°C у герметичній упаковці та використовувати з рамкою, яка постачається.
- Піпетування зразків та реагентів потрібно проводити якомога швидше в тій самій послідовності для кожного етапу.
- Використовуйте резервуари тільки для одного реагенту. Це особливо стосується резервуарів для субстрату. Використання резервуару для розчину субстрату, який до того, використовувався для розчину кон'югату може спричинити забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакони так, як може відбутися забруднення реагенту.
- Ретельно перемішайте вміст мікропланшетних лунок, щоб забезпечити добрі результати аналізів. Не використовуйте повторно мікролунки.
- Не допускайте, щоб лунки висихали під час аналізу; додавайте реагенти негайно після завершення етапів промивання.
- Почекайте поки реагенти досягнуть кімнатної температури (21°C до 26°C) перед початком тестування. Температура може вплинути на показники поглинання аналізу. Проте, на значення для зразків пацієнта не впливатиме.
- Ніколи не піпетуйте ротом та уникайте контакту реагентів та зразків зі шкірою та слизовими оболонками.
- Не куріть, не їжте, не пийте та не користуйтеся косметикою у місцях обробки зразків або реагентів набору.
- Одягайте одноразові латексні рукавиці під час обробки зразків та реагентів. мікробне забруднення реагентів або зразків може дати неправильні результати.
- Обробка повинна здійснюватися у відповідності з процедурами, визначеними відповідними національними правилами безпеки щодо біологічної небезпеки.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, який вказаний на етикетці.
- Всі вказані обсяги повинні виконуватися відповідно до протоколу. Оптимальні результати тесту можна отримати тільки після використання відкаліброваних піпеток та мікропланшетного зчитувача.
- Не змішуйте або використовуйте компоненти з наборів з різними номерами лотів. Не рекомендується міняти лунки різних пластин навіть одного лоту. Набори можуть транспортуватися або зберігатися в різних умовах, а характеристики зв'язування пластин можуть дещо відрізнятися.
- Хімічні речовини та підготовлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи відповідно до правил або вимог національної біологічної небезпеки.
- Щодо інформації про небезпечні речовини, які входять до набору зверніться до Паспорта безпеки даних. Паспорт безпеки даних для цього продукту доступний за запитом безпосередньо від DRG.

## 4. РЕАГЕНТИ

### 4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікротитрові лунки**, 12 x 8 (відривні) смужки, 96 лунок; Лунки покриті антигеном *Bordetella pertussis* та *Bordetella pertussis* toxin. (вкл. 1 тримач для смужок та 1 покривну фольгу).
2. **Розчинник для зразка\***, 1 флакон, 100 мл, готовий до використання, жовтого кольору; pH 7.2 ± 0.2.
3. **Поз. контроль\***, 1 флакон, 2.0 мл, готовий до використання; жовтого кольору, червона кришечка.
4. **Нег. Контроль\***, 1 флакон, 2.0 мл, готовий до використання; жовтого кольору, жовта кришечка.
5. **Контроль Cut-off \***, 1 флакон, 2.0 мл, готовий до використання; жовтого кольору, чорна кришечка.
6. **Ферментний кон'югат\***, 1 флакон, 20 мл, готовий до використання, червоного кольору, антитіло до людського IgG кон'югованого до пероксидази хрому.
7. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, Тетраметилбензидин (ТМБ).
8. **Стоп Розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, містить 0.2 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Уникайте контакту зі стоп розчином. Це може спричинити подразнення шкіри та опіки.
9. **Промивний розчин\***, 1 флакон, 30 мл (20X концентрований для 600 мл), pH 6.5 ± 0.1 див. «Підготовка реагентів».

\*Містить нертутий консервант.

#### 4.1.1 Необхідні матеріали, які не постачаються

- Мікропланшетний відкалібрований зчитувач (450/620 ± 10 нм) (напр. DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
- Відкалібровані змінні прецизійні мікропіпетки
- Інкубатор 37 °C
- Ручне або автоматичне обладнання для промивання лунок
- Вихровий міксер для пробірок
- Деіонізована або (свіжа) дистильована вода
- Таймер
- Абсорбуючий папір

#### 4.2 Умови зберігання та стабільність набору

За умови зберігання при температурі 2 - 8°C закриті реагенти залишаються реактивними до закінчення терміну придатності. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Відкриті реагенти слід зберігати при температурі 2°C - 8°C. Мікротитрові лунки потрібно зберігати при температурі 2°C - 8°C. Якщо герметичний мішечок відкрили, то знову щільно закрийте його. Відкриті набори зберігають активність протягом 2 місяців, за умови зберігання як описано вище.

#### 4.3 Підготовка реагентів

Дозвольте всім реагентам та необхідній кількості смужок досягнути кімнатної температури перед використанням.

#### Промивний розчин

Розведіть *Промивний розчин 1+19* (напр. 10 мл + 190 мл) зі свіжою стерильною повторно дистильованою водою. Цей розведений промивний розчин має значення рН 7.2 ± 0.2.

Споживання: ~ 5 мл /визначення.

Кристали у розчині зникають під час нагрівання до 37°C на водяній бані. Переконайтеся, що кристали повністю розчинилися перед використанням.

*Розбавлений промивний розчин стабільний протягом 4 тижнів при температурі 2°C - 8°C.*

#### 4.4 Утилізація набору

Утилізацію набору слід робити відповідно до національних вимог. Спеціальну інформацію про цей продукт можете знайти у Паспорті безпеки матеріалів.

#### 4.5 Пошкодження тестових наборів

У разі виникнення серйозних пошкоджень тестового набору або компонентів, компанію DRG слід проінформувати у письмовій формі не пізніше, ніж через тиждень після отримання набору. Сильно пошкоджені окремі компоненти не повинні використовуватися для тестового прогону. Їх потрібно зберігати, поки не буде знайдено остаточне рішення. Після цього їх слід утилізувати відповідно до офіційних правил.

### 5. ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

У цьому аналізі можна використовувати сироватку або плазму (ЕДТА-, гепарин- або цитратну плазму).

Не використовувати гемолітичні, іктеричні або ліпемічні зразки.

*Пам'ятайте:* Зразки, що містять азид натрію не можна використовувати в аналізі.

#### 5.1 Забір зразка

##### Сироватка:

Зробіть забір крові шляхом венепункції (напр. Sarstedt Monovette для сироватки), дозвольте згорнутися, та відділіть сироватку шляхом центрифугування при кімнатній температурі. Не центрифугуйте, поки кров повністю не згорнеться. Для зразків крові пацієнтів, які отримують антикоагулянтну терапію, потрібно більше часу для згортання.

##### Плазма:

Цільну кров потрібно зібрати у центрифужні пробірки, які містять антикоагулянт (напр. Sarstedt Monovette з відповідно підготовленою плазмою) та центрифугувати негайно після забору.

#### 5.2 Зберігання зразка

Зразки потрібно зберігати закритими до 24 годин при температурі 2°C - 8°C перед тестуванням. Для довготривалого зберігання, зразки потрібно заморозити при температурі -20°C тільки один раз. Розморожені зразки слід інвертувати кілька разів перед тестуванням.

#### 5.3 Розведення зразків

До початку тестування кожен зразок пацієнта потрібно спочатку розбавити **1 + 100** з *Розчинником для зразків*;

Напр. 10 мкл зразка + 1 мл *Розчинник для зразка* **добре перемішати, залишити настоюватися протягом 15 хвилин, добре перемішати перед використанням.**

**Зверніть увагу:** контролі готові до використання і не потрібно їх розбавляти!

### 6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

#### 6.1 Загальні зауваження

- **Дуже важливо довести всі реагенти, зразки та контролі до кімнатної температури перед початком тестового запуску!**
- Якщо тестування розпочато, то всі етапи слід пройти без перерви.
- Використовуйте новий одноразовий пластиковий наконечник для кожного стандарту, контролю або зразка, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Оптична щільність – це функція часу інкубації та температури. Перед початком аналізу, рекомендується, щоб усі реагенти були готові, кришечки зняті, всі необхідні лунки закріплені на тримачі і т. д. Це забезпечить рівний час для кожного етапу піпетування без переривання.
- Як правило, ферментативна реакція лінійно-пропорційна до часу та температури.
- Щільно закрийте флакони з реагентами негайно після використання, щоб уникнути випаровування або мікробного забруднення.
- Щоб уникнути перехресного забруднення та помилково завищених результатів піпетуйте зразки пацієнта та внесіть кон'югат не розбризкуючи його, на дно лунок.
- Під час інкубації при температурі 37°C, покрийте мікротитрові смужки фольгою, щоб уникнути випаровування.

#### 6.2 Процедура тестування

Перед початком аналізу, розбавте *Промивний розчин, підготуйте зразки пацієнтів, як описано в пункті 5.3*, добре перемішайте перед піпетуванням і обережно встановіть **план розподілу та ідентифікації**, який надається у наборі для всіх зразків і контролів.

1. Оберіть необхідну кількість мікротитрових смужок або лунок та вставте їх у тримач.  
Будь ласка, закріпіть:  

1 лунка (напр. A1)	Для бланк-субстрату,
1 лунка (напр. B1)	Для <i>Нег. Контролю</i> ,
2 лунки (напр. C1+D1)	Для <i>Cut-off контролю</i> та
1 лунка (напр. E1)	Для <i>Поз. контролю</i>

Користувачеві залишається визначити контролі та зразки пацієнта у дублікаті.

2. Внесіть  
**100 мкл *Нег. Контролю*** у лунку B1  
**100 мкл *Контролю Cut-off*** у лунки C1 та D1  
**100 мкл *Поз. контролю*** у лунку E1 і  
**100 мкл** кожного розведеного зразка з новим одноразовим наконечником у відповідні пробірки.
3. Накрийте лунки фольгою, яка постачається з набором. Інкубуйте протягом **60 хвилин при температурі 37°C**.
4. Різко потрусіть вміст лунок.  
Промийте пробірки **5 разів** розведеним *Промивним розчином (300 мкл на лунку)*. Переверніть лунки на абсорбуючий папір, щоб видалити залишки води.  
**Важлива примітка:**  
Чутливість та точність цього аналізу значно впливає на правильність проведення процедури промивання!
5. Внесіть **100 мкл *Ферментного Кон'югату*** у кожну лунку, **крім A1**.
6. Інкубувати протягом **30 хвилин при кімнатній температурі (20 °C до 25°C)**.  
*Не піддавати прямому впливу сонячного світла.*
7. Різко потрусіть вміст пробірок.  
Промийте пробірки **5 разів** розведеним *Промивним розчином* (300 мкл на лунку). Переверніть лунки на абсорбуючий папір, щоб видалити залишки води.
8. Додайте **100 мкл *Розчину Субстрату*** у всі лунки.
9. Інкубувати протягом **15 хвилин при кімнатній температурі (20°C до 25°C) у темряві**.
10. Зупиніть ферментну реакцію, додавши **100 мкл *Стоп Розчину*** у кожну лунку. Будь-який синій колір, який утворився під час інкубації перетворюється на жовтий.  
**Примітка:** високо позитивні зразки пацієнта можуть спричинити темний осад хромогену!
11. Зчитайте оптичну щільність при **450/620 нм** мікротитровим зчитувачем **протягом 30 хвилин** після додавання *Стоп Розчину*.

### 6.3 Вимірювання

**Відрегулюйте** зчитувач мікропланшетів або мікросмужок ELISA **до нуля**, використовуючи **бланк-субстрат в лунці A1**.

Якщо - з технічних причин - зчитувач ELISA не вдається встановити до нуля, використовуючи бланк-субстрат в лунці A1, відніміть значення поглинання лунки A1 від усіх інших значень абсорбції, щоб отримати достовірні результати!

**Виміряйте поглинання** всіх лунок **при 450 нм** і запишіть значення абсорбції для кожного контролю та зразка пацієнта у плані розповсюдження та ідентифікації.

Рекомендується подвійне зчитування довжини хвилі з використанням 620 нм як референсної довжини хвилі.

За необхідності **обчисліть середні значення поглинання** всіх дублікатів.

## 7. РЕЗУЛЬТАТИ

### 7.1 Перевірка тестового запуску

Тестовий запуск можна вважати дійсним, якщо дотримано наступних критеріїв:

<b>Субстрат-бланк у А1:</b>	Значення абсорбції <b>нижче ніж 0.100</b>
<b>Нег. Контроль у В1:</b>	Значення абсорбції <b>нижче ніж 0.200</b>
<b>Cut-off контроль у С1/D1:</b>	Значення абсорбції <b>між 0.350 – 0.850</b>
<b>Поз. контроль у Е1:</b>	Значення абсорбції <b>між 0.650 – 3.000</b>

### 7.2 Обчислення:

#### Середнє значення абсорбції Cut-off контролю [CO]

Обчисліть середнє значення абсорбції двох (2) визначень Cut-off контролю (напр. у С1/D1).

**Приклад:**  $(0.54 + 0.56)/2 = 0.55 = CO$

### 7.3 Інтерпретація

<b>ПОЗИТИВНИЙ</b>	Значення (середнє) абсорбції пацієнта більше ніж на 10% вище CO (Середнє значення ОЩ пацієнта $> 1.1 \times CO$ )
<b>СІРА ЗОНА</b>	Значення (середні) абсорбції пацієнта від 10% вище до 10 % нижче CO повторний тест через 2 - 4 тижні - з новими зразками пацієнтів ( $0.9 \times CO \leq$ Середнє значення ОЩ пацієнта $\leq 1.1 \times CO$ ) Результати у другому тесті знову в сірій зоні $\Rightarrow$ <b>НЕГАТИВНИЙ</b>
<b>НЕГАТИВНИЙ</b>	Значення (середні) абсорбції пацієнта більше ніж на 10% нижче CO (Середнє значення ОЩ пацієнта $< 0.9 \times CO$ )

### 7.3.1 Результати у одиницях DRG [DU]

Значення (середнє) абсорбції пацієнта  $\times 10 =$  [DRG Одиниці = DU]  
CO

Приклад:  $\frac{1.580 \times 10}{0.55} = 29 DU$

#### Інтерпретація результатів

Cut-off значення:	10 DU
Сіра зона:	9-11 DU
Негативний:	< 9 DU
Позитивний:	>11 DU

## 8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до державних і федеральних правил. Рекомендується використовувати контрольні зразки для забезпечення щоденної достовірності результатів. Використовуйте контрольні на нормальному та патологічному рівнях.

Також, рекомендується, використовувати національні або міжнародні програми оцінки якості, щоб забезпечити точність результатів.

Якщо результати аналізу не відповідають встановленим допустимим діапазонам контрольних матеріалів, результати пацієнта повинні вважатися недійсними.

У такому випадку, будь ласка, перевірте наступні технічні області: пристрої для піпетування та синхронізації; фотометр, термін придатності реагентів, умови зберігання та інкубації, способи аспірації та промивання.

Після перевірки вищезазначених пунктів, якщо ви не виявили помилки, зверніться безпосередньо до дистриб'ютора або DRG.

## 9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 9.1 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність визначається як ймовірність аналізу негативної оцінки за відсутності конкретного аналізу. Вона становить 95.24 %.

### 9.2 Діагностична чутливість

Діагностична чутливість визначається як ймовірність аналізу позитивної оцінки при наявності специфічного аналізу. Вона становить 95.49 %.

## 10 ОБМЕЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Бактеріальне забруднення або повторні цикли заморожування-розморожування зразка можуть впливати на значення абсорбції. У хворих з імунітетом і новонароджених серологічні дані мають обмежене значення.

### 10.1 Інтерферуючі речовини

Гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0.5 мг/мл) та тригліцериди (до 30 мг/мл) не впливають на результати.

## 11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

### 11.1 Надійність результатів

Випробування необхідно проводити точно згідно з інструкціями виробника. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватися правил GLP (Доброї лабораторної практики) або інших застосованих національних стандартів та / або законів. Це особливо актуально для використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати, в процедури тестування, достатню кількість контролів для перевірки точності та достовірності тесту.

Результати випробувань є дійсними, тільки якщо всі контролі знаходяться в межах вказаних діапазонів, і якщо всі інші параметри випробувань також входять до заданих специфікацій аналізу. У разі виникнення будь-яких сумнівів або занепокоєння звертайтеся до DRG.

### 11.2 Терапевтичні наслідки

Терапевтичні наслідки ніколи не повинні ґрунтуватися тільки на лабораторних результатах, навіть якщо всі результати випробувань узгоджуються з пунктами 11.1. Будь-який лабораторний результат є лише частиною загальної клінічної картини пацієнта. Тільки в тих випадках, коли результати лабораторних досліджень у прийнятній формі узгоджуються з загальною клінічною картиною пацієнта, слід вивести терапевтичні наслідки.

Сам результат тесту ніколи не повинен бути єдиним визначальним чинником для отримання будь-яких терапевтичних висновків.

### 11.3 Надійність

Будь-яка модифікація тестового набору та / або обміну або змішування будь-яких компонентів різних лотів від одного тестового набору до іншого може негативно вплинути на очікувані результати і обґрунтованість загального тесту. Такі зміни та / або обміни скасовують будь-які вимоги щодо заміни.

Претензії, подані внаслідок неправильного тлумачення результатів лабораторних досліджень згідно з пунктом 11.2, також є недійсними. Незалежно від того, у випадку будь-якої претензії, відповідальність виробника не повинна перевищувати вартість тестового набору. Виробник не несе відповідальності за будь-які пошкодження набору, що сталися під час транспортування.



#### **ВИРОБНИК**

ДРГ Інструментс ГмбХ  
вул. Фраунберг 18, 35039  
м. Марбург, Німеччина  
Тел: +49(0)64 21/170 00  
Факс: +49(0)64 21/17 00 50  
[www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drq@drq-diagnostics.de)



#### **УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК**

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

