

Haemophilus influenzae типу В ІФА

Імуноферментний аналіз для визначення IgG антитіл проти
полірібозилрібітолфосфату Haemophilus influenzae (гемофілічного грипу) типу В
у сироватці і плазмі людини

REF RE56351

 **96**

   **2-8°C**

EU: **IVD** 



I B L I N T E R N A T I O N A L G M B H

Flughafenstrasse 52a
D-22335 Гамбург, Німеччина

Телефон: +49 (0)40-53 28 91-0
Факс: +49 (0)40-53 28 91-11

IBL@IBL-International.com
www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1,
тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua

1. ПРИЗНАЧЕНЕ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз для визначення IgG-антитіл проти полірібозилрібітолфосфату (ПРФ) *Haemophilus influenzae* гемофілічного грипу типу В в сироватці та плазмі людини.

2. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ І ПОЯСНЕННЯ

Haemophilus influenzae гемофілічний грип типу В (HiB) - дуже поширена причина інвазивних критичних інфекційних захворювань у дітей до шести років. Після інфекції симптоми захворювання включають: перикардит, остеомієліт, менінгіт, енцефаліт, пневмонію, синусит та отит. У багатьох випадках хвороба смертельна або веде до неврологічного ураження, якому не завжди можна запобігти за допомогою швидкої антибактеріальної терапії.

Причиною захворювання, що лежить в основі захворювання дуже часто є прихований імунodefіцит з особливо зниженою гуморальною імунною відповіддю на полірібозилрібітолфосфат (ПРФ) в полісахаридній інкапсуляції бактерії. В дітей ще одна причина - незрілість імунної системи. Сьогодні часто це термін «імунodefіцитні пацієнти» використовуються, що включає всі набуті і вроджені специфічні та неспецифічні імунodefіцити.

Як наслідок, рекомендується для дітей віком від 3 місяців або старше вакцинація з різними типами ПРФ - вмісту вакцини. Це може призвести до чіткого зменшення кількості інфекцій з гемофілічним грипом типу В. Титр антитіл, отриманих вакцинацією, може бути використаний для підтвердження того, чи була вакцинація успішною. HiB IgG використовується для вимірювання рівня ПРФ - специфічних IgG-антитіл після 4-6 тижневого періоду після повної імунізації для моніторингу гуморального імунного статусу дітей чи інших осіб у групі ризику.

Моніторинг гуморального імуностатусу після вакцинації. Верифікація діагнозу "Гемофілічна" інфекція типу В грипу за допомогою повторного моніторингу концентрації антитіл. Оцінка ризику в пацієнтів із порушеннями імунітету, що призводять до провалу вакцинації з вакциною, що містить ПРФ.

Ця група включає:

Діти у віці до 2 років, що хворіють на *Haemophilus influenzae* гемофілічний грип типу В

Діти з хронічними, повторюваними бактеріальними інфекціями дихальних шляхів,

Діти з хронічним отитом,

Пацієнти з підтвердженими гуморальними імунodefіцитами (IgG-2-дефіцит, IgA-дефіцит),

Пацієнти з підтвердженими дефіцитами гранулоцитів,

Пацієнти під хіміо- або цитостатичною терапією

Діти після спленектомії,

Пацієнти з серповидно-клітинною анемією

Пацієнти з трисомією 21 (Даун) синдромом та певних етнічних груп.

3. ПРИНЦИП ТЕСТУ

HiB-IgG - двостадійний ІФА. Лунки в тест - стріпах ІФА покриті ПРФ. Під час інкубації розведеної сироватки або зразків плазми специфічні антитіла проти зв'язування з твердою фазою (інкубація зразка). Після процедури промивки всі зв'язані та неспецифічні компоненти змиваються. Під час другого етапу інкубації, реакції кон'югату, кон'юговані пероксидазою анти - IgG антитіла людини (анти-людський-IgG-HRP) позначають раніше спеціально зв'язані IgG. У другій промивній процедурі зв'язаний кон'югат видаляється. На третьому етапі інкубації відбувається реакція субстрату. Частина пероксидази зв'язаного кон'югату окисляє тетраметилбензидин (ТМБ) до синьої речовини. Ця реакція зупиняється додаванням сірчаної кислоти, а колір змінюється на жовтий. Інтенсивність кольору прямо пропорційна концентрації ПРФ - специфічних антитіл. Абсорбція вимірюється рідером ІФА на 450 нм. Концентрацію антитіл у зразку можна визначити з використанням еталонної кривої.

4. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

1. Тільки для діагностики in-vitro . Тільки для професійного використання.

2. Перед початком аналізу уважно прочитайте інструкції. Використовуйте дійсну версію інструкції, вкладеної в пакет. Будьте впевнені, що все зрозуміло.

3. У випадку серйозного пошкодження пакету набору звертайтеся до IBL або вашого постачальника у письмовій формі, не пізніше ніж через тиждень після отримання набору. Не використовуйте пошкоджені компоненти під час тестування, але зберігання їх безпечно для вирішення питань, пов'язаних з скаргою.

4. Перевірте номер та дату закінчення терміну придатності. Не змішувати реактиви різних партій. Не

використовуйте реагенти поза терміном придатності.

5. Дотримуйтесь належної лабораторної практики та правил техніки безпеки. Носити латексні рукавички, одноразові латексні рукавички та захисні окуляри, де це необхідно.

6. Реагенти цього комплекту, що містять шкідливий матеріал, можуть спричинити подразнення очей та шкіри. Дивіться МАТЕРІАЛИ НАДАНІ та мітки для деталей. Паспорти безпеки матеріалів для цього продукту доступні на IBL Homepage або напряму від IBL.

7. Хімічні речовини та підготовлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи згідно з національним законодавством щодо біологічно небезпечних речовин та інструкціями з безпеки та правилами техніки безпеки.

8. Прибірально-ники повинні керуватися фаховими керівництвами щодо потенційних небезпек і поводження.

9. Уникайте контакту з стоп розчином. Це може спричинити подразнення та опіки шкіри.

10. Всі реактиви цього комплекту, що містять людську сироватку або плазму, були протестовані та були виявлені негативними для анти-ВІЛ-інфекції I / II, HBsAg та анти - ВГС. Проте присутність цих чи інших інфекційних агентів не може бути виключена абсолютно. З цієї причини реагенти слід розглядати як потенційно біологічно небезпечні в процесі використання та утилізації.

5. ЗБЕРІГАННЯ І СТАБІЛЬНІСТЬ

Комплект постачається при температурі навколишнього середовища та зберігається при 2-8 ° С. Тримайте подалі від вогню або прямого сонячного світла. Зберігання та стабільність зразків та підготовлених реагентів зазначено у відповідних розділах. Стріпи мікропланшета стабільні до 6 місяців у розпечатаному, але щільно закритому пакеті при зберіганні при 2-8 ° С.

6. ЗАБІР ЗРАЗКІВ ТА ЗБЕРІГАННЯ

Людська сироватка, цитратна, ЕДТА- або гепаринова плазма.

Необхідно дотримуватися звичайних заходів для венепункції. Важливо зберегти хімічну цілісність зразка крові від моменту його збирання до аналізу. Не використовуйте сильно гемолітичні, жовтяничні або грубо ліпемічні зразки. Зразки, що з'являються мутними, повинні бути центрифуговані перед їх встановленням, щоб видалити будь-який твердий матеріал.

зберігання	2-8°C	нижче -20°C (аліквоти)	Тримати подалі від нагрівання або прямого сонячного проміння. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.
стабільність	6 тижнів	6 місяців	

7. МАТЕРІАЛИ НАДАНІ

кількість	символ	компонент
1x12x8	MTP	Мікропланшет покритий ПРФ гемофілічного гриппу тип В. Готовий до використання
1x0,3 мл	ENZCONJ CONC	ферментний кон'югат, концентрат антитіла людини-IgG – пероксидази ; синього кольору. Перед використанням розчиніть.
5x0,35 мл	CAL 1-5	Стандарт 1-5 CAL 1-5 , концентрат (NISBC code 09/222) Сироватка людини зі стабілізаторами та консервантами. Концентрація специфічна для кожної партії, як зазначено на етикетках для пляшок. Розріджуйте перед вживанням
2x0,35мл	POS LL, POS HL	Позитивний контроль LL+HL (низький рівень + високий рівень) концентрат, "Low Level", HL, "High Level"; для перевірки точності; людська сироватка із стабілізаторами та консервантами. Концентрації є специфічними для кожної партії, як зазначено на етикетках. Перед вживанням розбавте.
2x75 мл	DILBUF	Інкубаційний буфер (розчинник буфера) 0,01 М тріс / HCl; pH 7,4; містить миючий засіб; 0,01% (маса / об.) Тімеросал; червоного кольору. Готовий до використання.
1x100мл	WASHBUF CONC	Промивочний буфер концентрат (10x) містить:фосфатний буфер
1x15мл	TMB SUBS	ТМБ розчин субстрату ,містить ТМБ (тетраметілбензидін). Готовий до використання
1x15мл	TMB STOP	ТМБ стоп-розчин ,розчин, 0,5 М сірчаної кислоти. Готовий до використання
2 шт	FOIL	Клейова фольга

Примітка: Промивний буфер, субстрат та стоп-розчин можна замінити наступними продуктами: TBE / FSME IgG (RE57401), TBE / FSME IgM (RE57411), тетанус (RE57441) та дифтерія (RE57431).

8. МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ НАДАНІ

1. Мікропіпетки (Multipette Eppendorf або подібні пристрої, <3% CV). Об'єм: 20; 100; 500; 1000 мкл
2. Міксер вихровий
3. Пробірки для розведення зразків
4. 8-канальна мікропіпетка з резервуарами реагентів.
5. Промивна пляшка, автоматична або напіваавтоматична система промивання мікропланшетів.
6. Рідер мікропланшетів, здатний зчитувати абсорбцію при 450 нм (референтна довжина хвилі 600-650 нм)
7. Бідистильована або дейонізована вода
8. Паперові рушники, наконечники для піпетки та таймер

9. ПРОЦЕДУРА ПРИМІТКИ

1. Будь-яке неправильне поводження із зразками або модифікація процедури випробувань може вплинути на результати. Вказані обсяги піпетування, періоди інкубації, температури та етапи попередньої обробки повинні виконуватися суворо відповідно до інструкцій. Використовуйте лише калібровані піпетки та прилади.
2. Як тільки аналіз буде розпочато, всі кроки повинні бути завершені без перерви. Переконайтеся, що необхідні реагенти, матеріали та пристрої готові в належний час. Дозвольте всім реагентам та зразкам досягати кімнатної температури (18-25 ° C) і обережно прокрутити кожен флакон рідкого реагенту та зразки перед використанням. Змішувати реагенти без піноутворення.
3. Уникайте забруднення реагентів, піпеток та лунок / пробірок. Використовуйте нові одноразові наконечники для піпетки для кожного компонента та зразка. Не обмінюйте ковпачки. Завжди закривайте флакони, які не використовуються. Не використовувати повторно лунки / пробірки або реагенти.
4. Рекомендується визначати зразки в двох примірниках, щоб мати змогу виявити потенційні помилки в піпетуванні.
5. Використовуйте схему піпетування, щоб перевірити відповідний макет планшету.

6. Час інкубації впливає на результати. Всі лунки повинні оброблятися в однаковій послідовності, порядку та часу. Рекомендується використовувати 8-канальну мікропіпетку для піпетування розчинів у всіх лунках.
7. Промивання мікропланшету є важливим. Неправильно промиті лунки дадуть помилкові результати. Рекомендується використовувати багатоканальну піпетку або автоматичну систему промивки мікропланшетів. Не дозволяйте лункам висихати між інкубаціями. Не подряпайте покриті лунки під час промивання та аспірації. Змийте та заповніть всі реагенти з обережністю. Промиваючи, перевірте, чи точно всі лунки заповнені промивним буфером, і що в лунках немає залишків.
8. Вологість впливає на покриті лунки / пробірки. Не відкривайте пакет, поки він не досягне кімнатної температури. Невикористані лунки / пробірки повинні бути негайно повернені до закритого пакету, включаючи осушувач.

10. ІНСТРУКЦІЇ ПО ПЕРЕДТЕСТОВОМУ НАЛАШТУВАННЮ.

10.1. Підготовка компонентів.

Вміст набору для 96 визначень можна розділити на 3 окремі прогони. Об'єм, зазначений нижче, для одного прогону з 4 стріпами (32 визначення).

Розвести/ розчинити	компонент	з	розчинник	Співвід- ношення	примітки	Збері- гання	стабіль- ність
60 мл	ENZCONJ CONC	6 мл	DILBUF	1:101	Змішати обережно	2-8°C	1 година
30 мл	WASHBUF CONC	270 мл	Дист. вода	1:10	Змішати обережно	2-8°C	8 тижнів

10.2. Розведення стандартів, контролів та зразків.

	До розведення	з	співвідношення	примітки
CAL 1-5 CONTROL LL CONTROL HL	В цілому	DILBUF	1:26	Наприклад 20 мкл+500 мкл
Сироватка/плазма	В цілому	DILBUF	1:26	Наприклад 20 мкл+500 мкл

11. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

1	Прокапати 100 мкл розбавленого калібратора, розведених контролів та розбавленого зразка у відповідні лунки мікропланшета.
2.	Покрийте з клейкою фольгою Інкубуйте 1 годину при кімнатній температурі (18-25 ° C)
3.	Видаліть клейку фольгу. Видаліть інкубаційний розчин. Промивайте планшет 3 х з 250мкл розбавленого промивочного буфера. Видаліть надмірний розчин, натискаючи перевернутим планшетом на паперовий рушник
4.	Прокапайте 100 мкл розбавленого ферментного кон'югату в кожну лунку.
5.	Покрийте з клейкою фольгою . Інкубуйте 1 годину при кімнатній температурі (18-25 ° C)
6.	Видаліть клейку фольгу. Видаліть інкубаційний розчин. Промивайте планшет 3 х з 250мкл розбавленого промивного буфера. Видаліть надлишковий розчин, натиснувши перевернутим планшетом на паперовий рушник
7.	Для додавання субстрату та стоп-розчину використовуйте, якщо доступна, 8-канальну мікропіпетку. Піпетування слід проводити в ті ж часові інтервали для субстрату і стоп-розчину. Використовуйте позитивне заміщення та уникайте утворення повітряних бульбашок.
8.	Прокапати 100 мкл ТМБ розчину субстрату в кожну лунку.
9.	Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C)
10.	Зупиніть реакцію субстрату, додавши в кожну лунку 100мкл ТМБ стоп розчину. Коротко змішуйте вміст, обережно струшуючи планшет.
11.	Виміряйте оптичну густину фотометром при 450 нм ± 10 нм (референтна довжина хвилі: 600-650 нм) протягом 10 хв після піпетування стоп-розчину

12. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Результати випробувань є дійсними лише тоді, коли тест було виконано відповідно до інструкцій. Більше того, користувач повинен суворо дотримуватися правил GLP (належної лабораторної практики) або аналогічних стандартів / законів. Користувач та / або лабораторія повинні мати перевірену систему для отримання діагнозу відповідно до GLP. Всі контролю повинні бути знайдені в межах прийнятного діапазону, як зазначено на етикетках та сертифікаті якості. Якщо критерії не виконуються, прогін недійсний, і його слід повторити. Кожна лабораторія повинна використовувати відомі зразки як додаткові засоби контролю. Рекомендується брати участь у відповідних випробуваннях з оцінки якості. У разі будь-якого відхилення необхідно підтвердити такі технічні питання: терміни закінчення дії (підготовлених) реагентів, умови зберігання, піпетки, пристрої, умови інкубації та методи промивки.

13. РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Отримані ОГ стандартів (ось у, лінійні) наносяться навпроти їхньої концентрації (осі х, логарифмічна) або на напівлогарифмічному графічному папері, або за допомогою автоматизованого методу.

вісь х (log): Концентрація в [мкг / мл]

вісь у (лін): абсорбція (оптична густина)

Хороша відповідність забезпечується кубічним сплайном, 4 параметрами Logisits або Logit-Log. (Наприклад, 4-параметри рівняння 1)

Рівняння 1: $Y = d + (a-d) / (1 + (x / c)^b)$

Для розрахунку стандартної кривої застосовується кожен сигнал стандартів (при явних відхиленнях даних одного з двох повторень від очікуваного допустимо використовувати більш точне значення). Концентрацію цих зразків можна зчитати з стандартної кривої.

Приклади, що підозрюються, що містять концентрації вище, ніж найвищий стандарт, повинні бути розбавлені розчинником буфера. Вимірювані результати необхідно помножити з коефіцієнтом розбавлення для одержання коригованих результатів. Значення концентрації, отримані з цитованої плазми, повинні бути помножені на 1.1.

Критерії валідації:

Див. КЯ сертифікат.

14. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Визначення ПРФ - специфічних антитіл показує рівень гуморальної імунної реакції після імунізації з вакциною, що містить ПРФ вакциною або клінічною або очевидною інфекцією з *Haemophilus influenzae* гемофілічним грипом типу В. Якщо цей аналіз негативний і пацієнт належить до групи ризику ("Показання"), можна припустити, що існує ризик зараження *Haemophilus influenzae* гемофілічним грипом типу В. Гуморальні імунореакції після інфікування нетіпіруємою *Haemophilus influenzae* гемофілічною паличкою не виявляються HiB IgG. Відсутність сероконверту після вакцинації свідчить про здатність реагувати на бактеріальні вуглеводні антигени. Специфічний полісахаридний імунодефіцит може спостерігатися у пацієнтів з хронічним бронхітом, рецидивуючою пневмонією, внутрішньою бронхіальною астмою або бронхоектазами неясного генезису. У публікаціях [2, 8, 9, 10, 11] було показано, що концентрація антитіла нижче **0,15 мкг / мл** дає недостатній захист від *Haemophilus influenzae* гемофілічного грипу типу В.

Концентрація антитіла між 0,15 і 1,0 мкг / мл свідчить про те, що пацієнт був імунізований з ПРФ або мав інфікування HiB.

Проте лише **концентрація антитіл вище 1,0 мкг / мл** являє собою достатній природний імунітет або придбаний захист після третьої вакцинації.

15. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

Варіабельність в аналізі:

2 зразка в діапазоні концентрацій калібраторів вимірювали по 20 разів кожен з однією партією у подвійному визначенні. Варіабельність в аналізі була $\leq 10\%$.

Варіація між аналізами: POS HL високого рівня та POS LL низького рівня контролі вимірювали у 20 прогонах у різні дні, причому один лот у подвійному визначенні. Точність між аналізами становила від 9 до 12% відповідно.

Нижня межа виявлення: $\leq 0,1$ мкг / мл (лот-специфічна) .

16. СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Barra, A. et al.: Measurement of Anti-*Haemophilus influenzae* type B capsular polysaccharide antibodies by IFA. J. Immunol. Meth. 115, 111 (1988)
2. Claesson, BA. et al.: Development of serum antibodies of the immuno-globulin G class and subclasses against the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type B in children and adults with invasive infections. J. Clin. Microbiol. 26, 2549 (1988)
3. Dolan, K.T. et al.: An enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of *Haemophilus influenzae* type B polysaccharide-specific IgG1 and IgG2 in human and infant rhesus monkey sera. J. Immunoassay 12, 543 (1991)
4. Hetherington, S.V. et al.: Correlation between antibody affinity and serum bactericidal activity in infants. J. Infect. Dis. 165, 753 (1992)
5. Isaacs, D.: Infectious diseases. Editorial overview. Curr. Opin. Pediat. 4, 45 (1992)
6. Kristensen, K., Weis Bentzon, M.: Relation between enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay for the detection of antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type B. Acta. path. microbiol. immunol. scand. Sect. C 100, 142 (1992)
7. Lagergard, T. et al.: Comparison between radioimmunoassay and direct and indirect enzymelinked immunosorbent assay for determination of antibodies against *Haemophilus influenzae* type B capsular polysaccharide. J. Clin. Microbiol. 26, 2554 (1988)
8. Käyhty, H. et al.: Antibodies response to capsular polysaccharides of groups A and C *Neisseria meningitis* and *Haemophilus influenzae* type b during bacteremic disease. Infect. Dis. 143, 32 (1981)
9. Anderson, P.: The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type B. J. Infect. Dis. 149, 1034 (1984)
10. Zielen, S. et al.: Untersuchung zur Effektivität der *Haemophilus-influenzae*-B-Diphtherie-Konjugatimpfung bei deutschen Kindern. Monatsschr. Kinderheilkunde 140, 852 (1992)
11. Zielen, S., Ahrens, P.: *Haemophilus influenzae* Typ B-Impfserologie. Ellipse 11, 15 (1994)
12. Togni, G. u. a.: Präanalytik. Schweiz. Med. Forum. 6, 113-120 (2002)

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

REF	№ Кат.:
LOT	№ Партії:
	Використати до:
	Кількість тестів:
CONC	Концентрат
LYO	Ліофілізований
IVD	Медичний пристрій для діагностики in vitro
	Оціночний набір
	Прочитайте інструкцію перед використанням
	Зберігати поодаль від джерел тепла і прямого сонячного світла.
	Зберігати при температурі:
	Виробник:
	Увага!
Умовні позначення компонентів див. у розділі «Матеріали, що входять до набору».	

СКАРГИ: Первинно скарги можна пред'явити в письмовому вигляді або усно. Згодом необхідно подати їх, включаючи хід дослідження та отримані результати, в письмовому вигляді, з аналітичних міркувань.

ГАРАНТІЯ: Гарантується відсутність у продукті дефектних матеріалів у межах відповідного терміну придатності, а також дотримання специфікацій, поданих разом із продуктом. Продукт слід використовувати за призначенням, відповідно до всіх інструкцій, наведених в інструкції з використання та в межах відповідного терміну придатності продукту. Будь-яка модифікація процедури аналізу, або обміну, або змішування компонентів різних партій може негативно вплинути на результати. Ці випадки анулюють будь-які вимоги про заміну.

ОБМЕЖЕННЯ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ: ЗА БУДЬ-ЯКИХ ОБСТАВИН РІВЕНЬ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ВИРОБНИКА ОБМЕЖУЄТЬСЯ ЗАКУПІВЕЛЬНОЮ ВАРТІСТЮ ВКАЗАНОГО (-ИХ) НАБОРУ(ІВ) . ЗА ЖОДНИХ УМОВ ВИРОБНИК НЕ МАЄ НЕСТИ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ ЗА ВИПАДКОВІ ЧИ ПОБІЧНІ ЗБИТКИ, У ТОМУ ЧИСЛІ ВТРАТУ ПРИБУТКУ, ВТРАТУ ПРОДАЖ, ТРАВМИ ЛЮДЕЙ ЧИ ПОШКОДЖЕННЯ ВЛАСНОСТІ АБО ІНШІ ВИПАДКОВІ ЧИ НЕПРЯМІ ЗБИТКИ.

	IBL International GmbH	Тел .:	+ 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
	Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург,	E-MAIL:	IBL@IBL-International.com
	Німеччина	WEB:	http://www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд.19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua