

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgG ДО MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

MTB IgG

Кат. №: **MTBG.CE**

Дата випуску інструкції: **2020/09**
Версія: **3**



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

Імуноферментний аналіз (ІФА) для напівкількісного визначення антитіл IgG до Mycobacterium tuberculosis в сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для якісного та/або напівкількісного визначення антитіл IgG до Mycobacterium tuberculosis. Набір можна використовувати для спостереження за хворими на туберкульоз.

В. ВСТУП

Mycobacterium tuberculosis (MTB) — це вибаглива, повільно зростаюча, строго аеробна бактерія зі складною клітинною стінкою, що складається з пептидів-гліканів і багатьох складних довголанцюгових ліпідів. Туберкульоз залишається однією з найпоширеніших і смертельних хвороб у всьому світі. За останні 10 років у країнах старого світу спостерігається відродження туберкульозу, також через нові інфекції (ВІЛ) та імміграцію.

У діагностиці туберкульозу та під час спостереження за інфікованими пацієнтами ІФА на антитіла може бути корисним для надання інформації про імунологічний статус пацієнта, на додаток до тестів на нуклеїнову кислоту (або NAT), здатних визначити наявність бактерії.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті химерним рекомбінантним антигеном, що містить найбільш імуногенні епітопи MTB.

Тверду фазу спочатку обробляють розведеним зразком, і антигени проти MTB IgG захоплюються антигенами, якщо вони присутні, нанесеними на мікропланшет.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка під час 2-ї інкубації зв'язані антитіла до MTB IgG виявляються шляхом додавання поліклональних специфічних антитіл до hIgG, мічених пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, який пропорційний кількості антитіл проти MTB IgG, присутніх у зразку.

Таким чином, IgG у зразку можна напівкількісно визначити в arbU/мл (arbU/ml) за допомогою його значення S/Co та калібрувальної кривої.

Д. КОМПОНЕНТИ

Код MTBG.CE містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

1. Мікропланшет MICROPLATE

1 мікропланшет. 12 смужок з 8 відривними лунками, покритих химерним рекомбінантним антигеном, що містить найбільш імунодомінантні епітопи MTB. Планшети запаковані в пакет з осушувачем.

2. Негативний контроль: CONTROL -

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання. Містить 1% білків сироватки кози, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/- 0.1, 0,1% Твін 20, 0,09% Na-азид і 0,045% ProClin 300 в якості консервантів. Негативний контроль кодується оливково-зеленим кольором.

3. Позитивний контроль: CONTROL +

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання. Містить 1% білків сироватки кози, антитіла людини, позитивні до MTB, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0,5% Твін 20, 0,09% Na-азид,

0,045% ProClin 300 як консерванти. Позитивний контроль кодується темно-зеленим кольором.

4. Концентрат буферу для промивання: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшку (ml/bottle). 20-кратний концентрований розчин, що містить 0,045% ProClin 300 в якості консервантів. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буферу pH 7.0 +/-0.2, 0,05% Твін 20.

5. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання та маркований червоним кольором реагент. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому поліклональні антитіла кози до IgG людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) трис-буфер pH 6.8 +/-0.1, 0,045% ProClin 300 і 0,02% гентаміцин сульфат як консерванти.

6. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання компонент. Містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатний буферний розчин з pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0,03% тетраметилбензидину (або ТМБ) і 0,02% перекису водню (або H₂O₂).

Примітка: Зберігати в захищеному від світла місці, оскільки чутливий до сильного освітлення.

7. Розчинник для зразка: DILSPE

1x8 мл/флакон (ml/vial). 10 мМ (mM) трис-буферний розчин pH 8.0 +/-0.1, що містить 0,045% ProClin 300, для попередньої обробки зразків і контролів у планшеті, блокуючи перешкоди.

8. Сірчана кислота: H₂SO₄ 0.3 M

1x15 мл/флакон (ml/vial). Містить 0.3 M розчину H₂SO₄. Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

9. Ущільнювальна фольга для планшету 2 шт.

10. Вкладиш інструкції 1 шт.

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (200 мкл (μl) та 10 мкл (μl) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (подвійної дистиляції або деіонізації, оброблена деревиним вугіллем, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА, здатний забезпечити температуру +37 °C (°C).
6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Якщо набір використовується для скринінгу одиниць крові та компонентів крові, він повинен використовуватися в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерством охорони здоров'я або аналогічним органом) для проведення цього типу аналізу.
3. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
4. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
5. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не піддавайте Хромоген/Субстрат дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.

6. Після отримання, зберігайте набір при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
7. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
8. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо заміни набору.
9. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
11. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах).
12. Ставтеся до всіх зразків як до потенційно інфекційних. З усіма зразками сироватки людини слід поводитися на рівні біобезпеки 2, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, відповідно до того, що повідомляється у публікації Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека мікробіологічних та біомедичних лабораторій», вид. 1984 р.
13. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
14. Відходи, що утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв (min).
15. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
16. Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
17. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

G. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків; особливо азиду натрію, оскільки ця хімічна речовина вплине на ферментативну активність кон'югату, створюючи помилково негативні результати.
3. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові, настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
4. Гемолізовані («червоні») та явно гіперліпемічні («молочні») зразки слід утилізувати, оскільки вони можуть дати помилкові результати. Зразки, що містять залишки фібрину або важкі частинки або мікробні нитки та тіла, слід утилізувати, оскільки вони можуть привести до помилкових результатів.
5. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2 ° ... + 8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно виийняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід

заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.

6. Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2.000 об./хв. (rpm) протягом 20 хв. (min) або краще, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8μ для очищення зразка перед тестуванням.

H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на істотну втрату активності до 6 повторних використань пристрою та до 3 місяців.

Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету нагрітися до кімнатної температури (приблизно 1 год). Перевірте, щоб осушувач не став темно-зеленим, що вказує на дефект консервації. У такому випадку зателефонуйте в службу підтримки клієнтів Dia.Pro.

Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий мішечок з осушувачем, щільно застебнути на блискавку і зберігати при +2°-8°C (°C). При першому відкритті невикористані смужки стабільні, доки індикатор вологості всередині пакета з осушувачем не зміниться з жовтого на зелений.

Контролі:

Готові до використання. Перед використанням добре перемішайте.

Концентрат Промивного буфера:

20-кратний концентрований розчин необхідно розбавити водою класу EA до 1200 мл (ml) і обережно перемішати зверху до низу перед використанням.

Оскільки у флаконі можуть бути присутні кристали солі, щоб вони розчинилися під час приготування розчину.

Під час приготування уникайте спінування, оскільки наявність бульбашок може призвести до поганої ефективності промивання.

Примітка: після розведення, промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при +2...8 °C (°C).

Ферментний Кон'югат:

Готовий до використання. Добре перемішайте на вортексі перед використанням.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Якщо цей компонент потрібно перенести, використовуйте лише пластикові, можливо стерильні одноразові контейнери.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Не піддавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

Розчинник для зразків:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Сірчана кислота:

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

Легенда:

Попереджувальні **H-фрази:**

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає сильне подразнення очей.

Попереджувальні **P-фрази:**

P280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

P302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

P332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

P337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

Розчинник для зразків:

Готовий до використання. Добре перемішати на вортексі перед використанням.

I. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 2%. Також слід регулярно проводити дезактивацію розливів або залишків компонентів набору.
2. Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубації підходять як сухі інкубатори, так і водняні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
3. **Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкції виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очистити від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 M NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (μl/well) промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.
4. Час інкубації має допуск ± 5%.
5. Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартними характеристиками повинні бути (a) пропускна здатність ≤ 10 нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до ≥2.0; (c) лінійність до ≥2.0; (d) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.
6. При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі О «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для подачі рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена. Особливу увагу потрібно приділити, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для дозування та промивання. Це потрібно вивчити та контролювати, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за один запуск.
7. При використанні автоматичних пристроїв, якщо тримач для флаконів інструменту не підходить до флаконів, що постачаються в наборі, перелійте розчин у відповідні контейнери та промаркуйте їх такою ж етикеткою, що вилучена з оригінального флакону. Ця операція важлива для уникнення невідповідності вмісту флаконів під час їх перенесення. Коли випробування закінчено, поверніть вторинні марковані контейнери до 2..8°C, щільно закупоривши їх.
8. Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломки і не пролито рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
3. Розведіть увесь вміст 20-кратного концентрованого Розчину для промивання як описано вище.
4. Розчиніть Калібратор як описано вище.
5. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (приблизно 1 год), а потім перемішайте як описано.
6. Встановіть ІФА інкубатор на +37°C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи розведеним промивним розчином, згідно з інструкціями виробника. Установіть потрібну кількість циклів промивання, як зазначено в спеціальному розділі.
7. Перевірте, що ІФА зчитувач увімкнено або переконайтеся, що він увімкнений принаймні за 20 хвилин до зчитування.
8. Якщо використовується автоматизована робоча станція, увімкніть, перевірте налаштування та переконайтеся, що ви використовуєте правильний протокол аналізу.
9. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
10. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
11. У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

Автоматичне проведення аналізу:

У випадку, якщо тест виконується автоматично за допомогою системи ІФА, пропонуємо, щоб інструмент аспірував 200 мкл (μl) розчину зразка, а потім 10 мкл (μl) зразка.

Потім всю суміш обережно розподілити безпосередньо у відповідну лунку для зразків мікропланшета. Перед аспіруванням наступного зразка голки необхідно належним чином промити, щоб уникнути перехресного забруднення між зразками.

Не розбавляйте контролі/калібратор, оскільки вони готові до використання.

Розподіліть 200 мкл (μl) контролю/калібратора у відповідні лунки.

Важлива примітка: Візуально проконтролюйте, щоб зразки були розведені та подані у відповідні лунки. Це можна зрозуміти шляхом перевірки того, що колір доданих зразків став темно-блакитно-зеленим, тоді як колір негативного контролю залишився оливоково-зеленим.

Для наступних операцій дотримуйтесь інструкцій, наведених нижче для ручного аналізу.

Настійно рекомендується переконатися, що проміжок часу між подачею першого та останнього зразка буде розраховано приладом і враховано, відповідно відкладаючи перше промивання.

Ручне проведення аналізу:

1. Помістіть необхідну кількість Мікролунок у тримач. Лунку 1 залишіть порожньою для бланкування.
2. Потім додайте 200 мкл (μl) Негативного Контролю у трьох примірниках та 200 мкл (μl) Позитивного Контролю одноразово у відповідні лунки. Не розводите Контролі, оскільки вони готові до використання!
3. Додайте 200 мкл (μl) розчину для зразків (DILSPE) до всіх лунок із зразками; потім внесіть 10 мкл (μl) зразка в кожну правильно ідентифіковану лунку. Обережно перемішайте планшет, уникаючи переповерхнення та забруднення сусідніх лунок, щоб повністю розчинити зразок у розчиннику.

Важлива примітка: Переконайтеся, що колір Розчинника для зразка після додавання зразка змінюється зі світло-зеленого на темно-блакитно-зелений, контролюючи, чи дійсно було додано зразок.

- Додайте 50 мкл Розчинника для аналізу (DILAS) у всі лунки контролю/калібратора та зразка. Перевірте, чи колір зразків став темно-синім.
- Інкубувати мікропланшет протягом **45 хв при 37° C (°C)**.

Важлива примітка: смужки повинні бути заклеєні клейкою плівкою, що входить до набору, тільки тоді, коли тест виконується вручну. Не накривайте смужки під час використання автоматичних інструментів ІФА.

- Промийте мікропланшет автоматичним вошером шляхом доставки та аспірації 350 мкл/лунку (µl/well) розведеного промивного розчину, як повідомлялося раніше (розділ І.3).
- Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) Ферментного кон'югату в кожну лунку, за винятком 1 бланк-лунки, і накрийте герметичною плівкою. Переконайтеся, що цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, окрім А1.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкнутися внутрішньої поверхні лунки кінчиком піпетки під час видачі ферментного кон'югату. Може відбутися забруднення.

- Інкубувати мікропланшет **протягом 45 хв при +37° C (°C)**.
- Помити мікрорунки як на етапі 6.
- Внесіть піпеткою по 100 мкл (µl) суміші Хромогену/Субстрат у кожну лунку, включно з бланк-лункою А1. Потім інкубуйте мікропланшет **при кімнатній температурі (18-24° C (°C)) протягом 15 хвилин**.

Важлива примітка: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Може утворитися високий фон.

- Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) сірчаної кислоти у всі лунки, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 10. Додавання кислоти перетворить позитивні калібратори і позитивні зразки з блакитного на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність кольору розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, на фільтрі 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи інструмент на А1.

Загальні зауваження:

- Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
- Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися незначне самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

Н. СХЕМА АНАЛІЗУ

| Метод | Операції |
|-----------------------------------|--|
| Контролі | 200 мкл (µl) |
| Зразки (S) | 200 мкл (µl) DILSPE + 10 мкл (µl) |
| Розчинник для аналізу (DILAS) | 50 мкл (µl) |
| 1-а інкубація | 45 хв |
| Температура | +37 °C (°C) |
| Етап промивання | 5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування |
| Ферментний кон'югат | 100 мкл (µl) |
| 2-а інкубація | 45 хв |
| Температура | +37 °C (°C) |
| Крок промивання | 5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування |
| ТМБ/Н ₂ О ₂ | 100 мкл (µl) |
| 3-я інкубація | 15 хв |
| Температура | КТ |
| Сірчана кислота | 100 мкл (µl) |
| Зчитування ОЩ | 450 нм (nm) /620-630 нм (nm) |

Нижче наведено приклад схеми розподілу:

Мікропланшет

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | BLK | S4 | | | | | | | | | | |
| B | NC | S5 | | | | | | | | | | |
| C | NC | S6 | | | | | | | | | | |
| D | NC | S7 | | | | | | | | | | |
| E | PC | S8 | | | | | | | | | | |
| F | S1 | S9 | | | | | | | | | | |
| G | S2 | S10 | | | | | | | | | | |
| H | S3 | S11 | | | | | | | | | | |

Легенда: BLK = Бланк NC = Негативний контроль
PC = Позитивний контроль S = Зразок

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації здійснюється на контролях і калібраторі щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи їхні значення ОЩ450 нм (nm) / 620-630 нм (nm) відповідають як очікувалося, і чи вони вказані в таблиці нижче.

| Перевірка | Вимоги |
|--------------------------|---|
| Бланк-лунка | < 0.100 значення ОЩ450 нм (nm) |
| Негативний контроль (NC) | <0.050 середнє значення ОЩ450 нм (nm) після бланкування |
| Позитивний контроль | ≥ 0.500 значення ОЩ450нм |

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі, а проведіть наступні перевірки:

| Проблема | Перевірка |
|---|---|
| Бланк-лунка >0.100 ОЩ450 нм (nm) | 1. щоб розчин Хромогену/Субстрату не був забруднений під час аналізу |
| Негативний Контроль (NC) >0.050 ОЩ450 нм (nm) після бланкування | 1. щоб процедури промивання та налаштування вошера були підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний відповідний миючий розчин і вошер був праймований ним перед використанням; 3. не було допущено жодної помилки в процедурі аналізу (видача позитивного контролю замість негативного); 4. що жодного забруднення негативного контролю або його лунок не відбулося через позитивні зразки, розлив або ферментний кон'югат; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або кон'югатом ферменту 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забруднені |
| Позитивний Контроль < 0.500 ОЩ450 нм (nm) | 1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний контроль замість позитивного). У такому випадку, негативний контроль буде становити >0.150 ОЩ450 нм (nm), також. 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення контролю. |

Якщо виникла одна з цих проблем, після перевірки повідомте керівника для подальших дій.

Важлива примітка: Аналіз слід виконувати, як етап зчитування, описаний у розділі М, пункт 12.

Р. РЕЗУЛЬТАТИ

Р1. Якісний аналіз

Обчисліть середнє значення ОЩ450 нм (nm)/620-630 нм (nm) для негативного контролю (NC), а потім застосуйте таку формулу:

$$\text{CUT-OFF} = \text{NC} + 0.350$$

P2. Напівкількісний аналіз

Обчисліть значення зразка/Cut-off (або S/Co) для Контролів та для зразків. Призначте негативному контролю значення 0 arbU/мл (arbU/ml) і позитивному контролю значення 100 arbU/мл (arbU/ml). Потім на лінійно-міліметровому папері проведіть лінію між значеннями Негативного та Позитивного контролю.

Значення S/Co зразків потім перетворюються в arbU/мл (arbU/ml) за допомогою кривої, що забезпечує напівкількісне визначення вмісту IgG у зразку.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У **якісному методі** зразки зі значенням ОЩ 450 нм (nm), нижчим від значення Cut-Off, вважаються негативними для анти-MTB IgG.

Зразки зі значенням ОЩ450 нм ф9nm)/620-630 нм (nm) вище, ніж значення Cut-Off, вважаються позитивними для анти-MTB IgG.

У **напівкількісному методі** можлива кількісна оцінка вмісту IgG в arbU/мл (arbU/ml) для тих зразків, які показують ОЩ450 нм (nm)/620-630 нм (nm) вище, ніж граничне значення (або S/CO > 1); це дає можливість клініцисту стежити за імунологічним статусом хворого на туберкульоз.

Важливі примітки:

1. *Інтерпретація результатів повинна проводитися під наглядом керівника лабораторії, щоб зменшити ризик невірних інтерпретацій та помилок у судженнях.*
2. *Тести на антитіла самі по собі не дають клініцисту достовірного діагнозу туберкульозу. Необхідно провести додаткові тести (наприклад, NAT).*
3. *Коли результати тестувань передаються з лабораторії в іншу установу, необхідно звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.*
4. *Діагноз повинен поставити і передати пацієнту лікар з відповідною кваліфікацією.*

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінку продуктивності проводили на панелях позитивних і негативних зразків з посиланням на референсний набір з маркуванням CE.

1. Діагностична специфічність та чутливість:

Діагностична **чутливість** була розрахована на панелі позитивних зразків, отриманих від пацієнтів, від пацієнтів із клінічно очевидною ознакою туберкульозу, наданих національним центром з контролю туберкульозу.

При використанні референсного пристрою спостерігалось значення > 95%.

Діагностична **специфічність** була розрахована на панелі зразків, отриманих від звичайних людей, без жодної історії захворювання на туберкульоз, і донорів крові.

Спостерігалось значення > 95%.

Ці висновки підсумовані в наступній таблиці.

| | |
|---------------|-------|
| Чутливість | > 95% |
| Специфічність | > 95% |

2. Відтворюваність:

Дослідження, проведене на трьох зразках різної реактивності проти M.tuberculosis IgG, досліджених у 16 повторях у трьох окремих запусках, показало значення KV% у діапазоні 10-20% залежно від показників ОЩ450 нм (nm)/620-630 нм (nm).

Змінюваність, показана в таблицях, не призвела до неправильної класифікації зразка.

S. ОБМЕЖЕННЯ

Заморожені зразки, що містять частинки або агрегати фібрину, можуть давати хибнопозитивні результати.

ІФА для виявлення антитіл до M.tuberculosis визнано медичною літературою як надання лише обмеженої інформації про стан пацієнтів і вимагає інших тестів для більш надійної діагностики туберкульозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). Sherris Medical Microbiology, 4th ed., McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.
2. Cole ST; Brosch R; Parkhill J; et al. (1998). "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence." Nature 393: 537-544.

3. Camus JC; Pryor MJ; Medigue C; Cole ST. (148). "Re-annotation of the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv". Microbiology 2002: 2967-2973.
4. Flowers T (1995). "Quarantining the noncompliant TB patient: catching the "Red Snapper"". Journal of health and hospital law : a publication of the American Academy of Hospital Attorneys of the American Hospital Association 28 (2): == h == 95-105. PMID 10141473.
5. Madigan, Michael; Martinko, John (editors) (2005). Brock Biology of Microorganisms, 11th ed., Prentice Hall. ISBN 0- 13-144329-1.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила ISO 13485. Кожна партія проходить контроль якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it

ТОВ ДІА.ПРО

Діагностік Біопробс с.р.л.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (МІ) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it



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
www.diameb.ua

