

НАБІР ІФА
ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ IgG
ДО АНАТОКСИНУ ДИФТЕРІЇ

1760-28, Diphtheria Toxoid IgG

Каталог. №: 1760-28
Кількість : 96
Виробник : DAI, (США)

Методика від 10-10-2009



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

Для діагностичного застосування In Vitro

Тест	Diphtheria Toxoid IgG ELISA
Метод	Твердофазний імуносорбентний аналіз
Принцип	Непрямий ІФА: покритий антигенами планшет
Діапазон визначення	0,004-3 МО/мл
Зразок	10 мкл сироватки
Специфічність	96 %
Чутливість	0,006 МО/мл
Загальний час	~ 90 хв.
Термін зберігання	12 місяців

**Лабораторні результати ніколи не можуть бути єдиною основою для медичного висновку. Історія хвороби пацієнта та подальші дослідження повинні бути взяті до уваги*

ПРИЗНАЧЕННЯ

Даний набір виробника призначений для визначення in vitro специфічних антитіл класу IgG до токсину дифтерії в сироватці крові, з метою визначення захисного стану до і після вакцинації. Достатня кількість матеріалів що постачаються розраховані максимально на 39 зразків для дослідження в дублях або 87 окремих зразків, з 7-точковою калібрувальною кривою двома контролями. 7-точкова калібрувальна крива може бути скорочена до п'яти точок, якщо не вимагається вимірювання нижче 0,037 МОд/мл.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Мікролунки попередньо покриті антигеном анатоксину дифтерії. Калібратори, контролі та розведені зразки пацієнтів додають в лунки, а антитіла, які розпізнають антиген дифтерійного анатоксину, зв'язуються під час першої інкубації. Після промивання лунок для видалення незв'язаних білків, додається очищений кон'югат пероксидази, поміченої кролячим анти-людським IgG (γ-ланцюжок специфічний). Кон'югат зв'язується із захопленням антитілом людини і надлишок незв'язаного кон'югату видалюється шляхом додаткової стадії промивки.

Зв'язаний кон'югат візуалізується субстратом 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ), що дає продукт реакції синього кольору, інтенсивність якого пропорційна концентрації антитіл в зразку. Фосфорну кислоту додають в кожну лунку для зупинки реакції. Це призводить до жовтого кольору в кінцевій точці, який зчитується при 450 нм.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Всі сироватки людини, які поставляються були перевірені на рівні донорів і виявились негативними до поверхневого антигену вірусу гепатиту В, антитіл до ВІЛ-1 і 2, вірусу гепатиту С. Тим не менше, ці тести не можуть гарантувати відсутності носіїв інфекцій. Слід забезпечити правильне використання та методи утилізації і тільки кваліфікований персонал, який допущений до роботи з потенційно інфікованими матеріалами, повинен мати дозвіл на застосування цього набору реагентів.
- Азид натрію може реагувати зі свинцем і міддю, утворюючи вибухові азиди металів. При утилізації реагенти слід змити великою кількістю води, щоб запобігти накопиченню азидів.
- Буфери і сироватки, які поставляються в цьому наборі містять різні інгібітори ферментів, які перераховані нижче. Вони токсичні і повинні використовуватися з обережністю.

ІНГІБІТОР	КОНЦЕНТРАЦІЯ
Катон	0,02%
Азид натрію	0,099%
Проклін 300	0,045%
Бромонітродіоксан	0,002%
Метилізотіазон	0,002%

- Катон є подразником і може викликати чутливість шкіри.
- Стоп-розчин містить 3М фосфорну кислоту, яка викликає корозію. Щоб уникнути опіків не дозволяти контакту зі шкірою та очима.
- Розливання реагентів потрібно належним чином очищати, дотримуючись місцевих екологічних норм.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Даний виріб слід використовувати тільки спеціально підготовлених персоналом.
- Рекомендується суворе дотримання протоколу дослідження. Будь-яке відхилення може вплинути на продуктивність цього чутливого аналізу. Якщо в результаті отриманої оптичної щільності низькі показники зчитування, це може вплинути на чутливість аналізу. Зверніть увагу на окремі "Примітки" та попередження протягом усієї Інструкції щодо застосування.
- Реагенти з різними номерами партій **НЕ** є взаємозамінними. Якщо проводиться велика кількість досліджень, слід подбати, щоб всі реагенти були з тієї ж партії. Всі тест-смужки повинні бути взяті з однієї сумки з фольги. Заміна будь-якого компонента може призвести до неправильних результатів.
- Щоб уникнути забруднення реагенту, необхідно використовувати тільки новий або чистий пластиковий / скляний посуд. Ніколи не повертайте невикористані реагенти у флакони.
- Не залишайте без ковпачків пляшки з реагентами; будь-яке наступне випаровування або забруднення призведе до суперечливих результатів.
- Субстрат ТМБ не повинен піддаватися впливу світла або води.
- Мікробіологічно забруднена, гемолізована або ліпемічна сироватка і зразки, що містять тверді частки, не повинні використовуватись.
- Неточне розбавлення зразка не може бути перевірене оскільки контролі готові до використання. Рекомендується застосування відкаліброваних дозаторів та відповідний зразків внутрішнього контролю якості.
- Використання автоматизованих систем аналізу, розчинів для розведення зразків та іншого автоматизованого обладнання може привести до відмінностей в результатах в порівнянні з ручною процедурою. Будь-яка лабораторія несе відповідальність за достовірність системи дослідження, а також в межах діапазону забезпечує результати, як визначено у даній інструкції та відповідному сертифікаті КЯ.
- Все обладнання, що використовується повинно бути відкаліброване та обслуговуватись відповідно до інструкцій виробника.

ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

- Набір повинен зберігатися при температурі 2-8°C і не повинен заморожуватись. Невідповідна температура зберігання вплине на результати.
- Буфер для промивання, розведений в чистій ємкості може зберігатися при кімнатній температурі протягом максимум 4 тижнів.
- Термін придатності набору вказаний на його зовнішній етикетці.

ВЗЯТТЯ І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

- Зразки крові повинні бути зібрані венепункцією, згорнутися природним способом та сироватку відділити.
- Сироватку можна зберігати при 2-8 ° C протягом 48 год до аналізу, або при тривалому терміні зберігання в нерозбавленому вигляді при -20 ° C або нижче.
- Слід уникати повторного заморожування і розморожування.
- Зразки сироватки не повинні бути інактивовані нагріванням, так як це може дати помилково позитивні результати.

МАТЕРІАЛИ

- Інструкція користувача: Надання повної інформації щодо аналізу.
- Сертифікат КЯ : Вказує на очікувані показники партії контролів.
- Лунки покриті анатоксином дифтерії: 12 відламуваних 8-лункових смужок покритих дифтерії анатоксином, отриманим з *Corynebacterium diphtheriae*. Планшет упакований в запакований мішочок із фольги і містить дві пакетики з осушувачем.

- Розріджувач зразка: 2 пляшки, що містять 50 мл буферу для розведення зразків. Кольору жовтого, готовий до використання.
- Промивний буфер: 1 флакон, що містить 50 мл 20-кратно концентрований буфер для промивання лунок.
- Калібратори дифтерійного анатоксину IgG: 7 пляшок кожна з яких містить 1,2 мл розведеної сироватки крові людини з наступними концентраціями антитіл анти-дифтерійного анатоксину: 3, 1, 0,333, 0,111, 0,037, 0,012 і 0,004 МОд/мл. Готовий до використання.
- Високий контроль дифтерійного анатоксину IgG: 1 флакон, що містить 1,2 мл розведеної сироватки крові людини з антитілами до дифтерійного анатоксину. Очікуване значення вказане у сертифікаті контролю якості. Готовий до використання.
- Низький контроль дифтерійного анатоксину IgG: 1 флакон, що містить 1,2 мл розведеної сироватки крові людини з антитілами до дифтерійного анатоксину. Очікуване значення вказане у сертифікаті контролю якості. Готовий до використання.
- Кон'югат дифтерійного анатоксину IgG: 1 флакон, що містить 12 мл очищеної пероксидази мічених антитіл до людського IgG. Кольору червоного, готовий до використання.
- Субстрат ТМБ: 1 флакон, що містить 14 мл субстрату ТМБ. Готовий до використання.
- Стоп - розчин: 1 флакон, що містить 14 мл фосфорної кислоти 3М. Готовий до використання.

ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ І ОБЛАДНАННЯ - не поставляються

- Автоматичний мікропланшетний вошер: рекомендується, однак промивання може бути виконане вручну.
- Планшет-рідер: Здатен вимірювати оптичну щільність при 450 нм відносно повітря.
- Дистильована або деіонізована вода: має бути найвищої якості.
- Відкалібрована мікропіпетка : для дозування 1000, 100 і 10 мкл.
- Багатоканальний дозатор: рекомендується для дозування 100 мкл кон'югату, субстрату та стоп-розчину.
- Скляні / пластикові пробірки: для розведення зразків.

МЕТОД АНАЛІЗУ

Підготовчі етапи

1. Доведення набору до кімнатної температури.

- Набір розрахований для роботи при кімнатній температурі (20-24 °C).
- Вийміть набір з місця зберігання і витримайте при кімнатній температурі протягом приблизно 60 хвилин. Лунки не потрібно виймати із фольги поки вони не досягли кімнатної температури.

Примітка: набори можуть бути збережені при кімнатній температурі протягом 1 тижня.

2. Склад набору

Акуратно перемішайте кожен компонента набору перед використанням.

3. Розведення буферу для промивання

Додати 50 мл концентрату розчину буферу для промивання до 950 мл дистильованої води (розбавлення 1 до 20) в чисту ємкість та перемішати. Менші об'єми можуть бути розведені відповідно.

Примітка: Розведений промивний буфер може зберігатися при кімнатній температурі до 4 тижнів, тому розбавляти тільки відповідний об'єм.

4. Розведення зразків

Розвести 10 мкл кожного зразка 1000 мкл розчинника зразка (1:100) та і добре перемішати.

Примітка: розведений зразок необхідно використати протягом 8 годин.

5. Поводження зі стріпами та рамкою для тримання

Встановити необхідну кількість лунок в тримач. Почати розміщення із лунки А1, заповнюючи стовпці зліва направо по всьому планшету. При роботі з планшетом затисніть виступаючі краї рамки для тримання, запобігаючи випаданню лунок.

Примітка: Поверніть відразу невикористані лунки до пакету із фольги з двома осушувачами і щільно закрийте, зводячи до мінімуму впливу вологи. Будьте обережні, щоб не проколоти або розірвати пакет з фольги, див. нижче.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: піддавання лунок впливу вологи і забруднення твердими частинками пилу або іншими частинами речовин призведе до погіршення якості антигенів, що спричинить низьку точність аналізу і потенційно помилкові результати.

МЕТОД АНАЛІЗУ

Дотримуватись аналогічної послідовності дозування протягом аналізу.

1. Розведення зразка

Внесіть 100 мкл кожного калібатора, контролю та розбавленого зразка (1:100) у відповідні лунки планшету.

Примітка: Зразки мають бути додані якомога швидше до планшету, щоб мінімізувати зміщення результатів аналізу, а також таймер запускається після додавання останнього зразка. **Інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.**

2. Промивання

Процедура промивання є надважливою і вимагає особливої уваги. Неправильно промитий планшет може дати неточні результати, з низькою точністю та високими фоновими показниками.

Після інкубації взяти планшет та промити лунки 3 рази 250-350 мкл промивного буфера на лунку. Промити планшет або за допомогою автоматичного вошера або вручну, як зазначено нижче. Після остаточного промивання перевернути планшет та витрусити вміст лунок на фільтрувальний папір.

Планшети можуть бути промиті вручну наступним чином:

- Витрусити вміст планшету в раковину.
- Висушіть лунки на фільтрувальному папері.
- Заповніть кожну лунку 250-350 мкл промивного буферу за допомогою багатоканального дозатора.
- Акуратно струсіть пластину на рівній поверхні.
- Повторіть етапи а-г двічі.
- Повторіть етапи а і б.

3. Додавання кон'югату

Внесіть 100 мкл кон'югату в кожну лунку, промокніть лунки в верхній частині тканиною, щоб видалити будь-які бризки.

Примітка: Щоб уникнути забруднення, ніколи не повертаються надлишки кон'югату у флакон з реагентом.

Інкубувати при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

4. Промивання

Повторіть етап 2.

5. Додавання субстрату (ТМБ)

Додайте 100 мкл ТМБ-субстрату в кожну лунку, промокніть лунки в верхній частині тканиною, щоб видалити будь-які бризки.

Примітка: Щоб уникнути забруднення, ніколи не повертаються надлишки ТМБ у флакон з реагентом.

Інкубувати в темному місці при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

6. Зупинка реакції

Внесіть 100 мкл стоп-розчину в кожну лунку. Це викликає зміну кольору від синього до жовтого.

7. Вимірювання оптичної щільності

Зчитувати оптичну щільність (ОЩ) в кожній лунці при 450 нм на мікропланшетому рідеру протягом 30 хвилин після зупинки реакції.

Примітка: Див п. 1 у розділі 8 нижче.

РЕЗУЛЬТАТИ І КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

1. Налаштування рідера

Це особливо чутливий аналіз для точного вимірювання низьких показників зразків. Не рекомендується віднімати від результатів ОЩ зчитування бланку. До того ж оптичні щільності повинні зчитуватись при 450 нм без використання референтного фільтра.

2. Контроль якості

Для того, щоб аналіз був дійсний, всі наступні критерії повинні бути виконані:

- Калібратори і контролю повинні бути включені в кожній процедурі.
- Значення, отримане для кожного контролю повинні бути в діапазоні, зазначеному на сертифікаті контролю якості.
- Крива за формою повинна бути схожа на калібрувальну криву, відображену в сертифікаті контролю якості.

Якщо наведені вище критерії не виконуються, аналіз є недійсним і підлягає повторенню.

3. Розрахунок середніх оптичних щільностей (в аналізах проводити постановку в дублях)

Для кожного калібратора, контролю та зразка обчислити середню ОЩ зчитувань в дублях. Відсотковий коефіцієнт варіації (КВ%) для кожного дублікату ОЩ повинен бути менше 15%.

4. Побудова калібрувальної кривої

Калібрувальна крива може бути побудована або автоматично, або вручну шляхом побудови в логарифмічному масштабі концентрації антитіл анатоксину дифтерії проти ОЩ кожного калібратора на лінійній шкалі

- Автоматична - використовувати підтвержене відповідним чином програмне забезпечення та шаблон кривої, що найкраще підходить до даних.

- Вручну - використовуючи логарифмічний/міліметровий папір, намалювати плавну криву через точки (не пряму лінію або від точки до точки).

5. Інтерпретація невідповідних точок

Якщо одна точка не лежить на кривій, вона може бути видалена. Якщо за відсутності цієї точки крива має форму, яка відрізняється від калібрувальної кривої зразка, або більш ніж одна точка має відхилення, то аналіз слід повторити.

6. Розрахунок контрольних значень

Зчитати рівень антитіл до дифтерійного анатоксину у контролях безпосередньо з калібрувальної кривої. Значення має бути в межах, заданих в сертифікаті контролю якості.

7. Розрахунок рівня антитіл в розбавлених зразках

Зчитати рівень антитіл до дифтерійного анатоксину в розбавлених зразках безпосередньо з калібрувальної кривої.

Примітка: значення калібруатора були скориговані на коефіцієнт 100 для співвідношення 1:100 розведення зразка. Ніякої додаткової корекції не потрібно.

8. Калібрування

Аналіз відкалібрований згідно еталонного препарату анитоксину дифтерії NIBSC 00/496, результати представлені в МОд/мл.

9. Обмеження

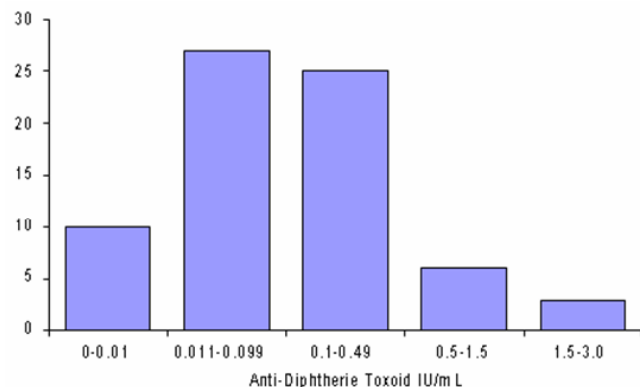
- Зразки до і після вакцинації повинні аналізуватись одночасно.
- Цей набір може бути використаний для полегшення діагностики імунодефіциту. Результати мають бути підтверджені клінічними даними та іншими серологічними тестами.
- Результати, отримані в цьому аналізі не є діагностичним доказом відсутності захисту/захисту від дифтерії або наявності чи відсутності імунодефіциту.

РІВНІ ЗАХИСТУ

Рівень захисних антитіл в нормальній популяції, вказаний в літературі, знаходиться і межах 0,01 та 0,1 МОд/мл. Інструкція ВООЗ5 зазначає, що мінімальний захисний рівень вважається 0,01 МОд/мл дифтерійного анитоксину в зразку сироватки. Більш високий рівень 0,1 МОд/мл бажаний для індивідуального захисту. У зв'язку з широким діапазоном наведеним вище, рекомендується, щоб кожна лабораторія визначала свої власні норми захисного діапазону.

ТИПОВІ ЗНАЧЕННЯ

Рівні IgG антитіл дифтерійного анатоксину були виміряні у сироватці 80 здорових дорослих донорів крові (з невідомим станом вакцинації та імунним статусом). Результати, що відображаються нижче, призначені тільки для ілюстрації і не повинні бути використані для розрахунку норми.



ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точність

Точність в межах та між аналізами вимірювалась з використанням трьох зразків у діапазоні калібрувальної кривої. Концентрація та % КВ для кожного зразка наведені нижче:

ТОЧНІСТЬ В АНАЛІЗІ

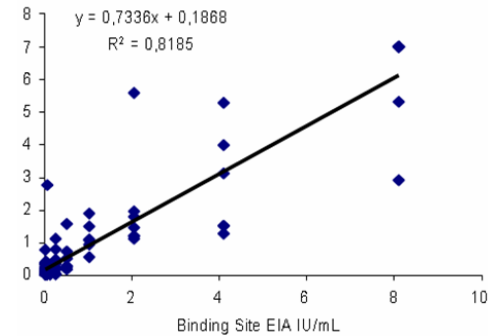
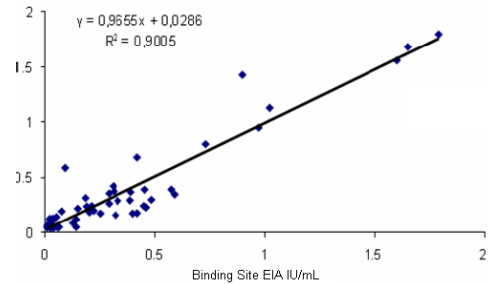
n=16	Концентрація (МОд/мл)	% КВ
Зразок 1	0,095	6,1
Зразок 2	0,46	6,5
Зразок 3	2,26	4,2

ТОЧНІСТЬ МІЖ АНАЛІЗАМИ

n=3	Концентрація (МОд/мл)	% КВ
Зразок 4	0,024	7,1
Зразок 5	0,42	4,2
Зразок 6	1,73	1,8

СПІВВІДНОШЕННЯ

- Відносно альтернативного ІФА-набору анатоксину дифтерії з використанням 80 зразків:



ВПЛИВАЮЧІ РЕЧОВИНИ

Впливаючі речовини різних значень були введені у високі та низькі зразки, які були потім послідовно досліджені. Метод, використовуваний для перевірки цих речовин, був закладений в основу інтерферентного набору Check A Plus™ Кокусай Шіяку, Японія.

Речовина	Концентрація
Білірубін (вільний)	18,1 мг/дл
Білірубін (кон'югат)	21,6 мг/дл
Гемолізований гемоглобін	480 мг/дл
Лімфа	2473 одиниць

Відсутність впливу не спостерігалася в жодному досліджуваному зразку.

АНАЛІТИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ

Чутливість визначалась як середнє значення концентрації від 20 визначень розріджувача зразка. Це відповідає 0,006 МОд/мл.

ДІАПАЗОН ВИМІРЮВАННЯ

Діапазоном вимірювання аналізу є значення 3,0-0,004 МОд/мл на основі всіх 7 калібраторів.



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
www.diameb.com