

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgG ДО ПРАВЕЦЕВОГО АНАТОКСИНУ

TETOX IgG

Кат. №: TETG.CE

Дата випуску інструкції: 2020/03
Версія: 4



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 кількісного визначення IgG антитіл до Правцевого анатоксину у сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

A. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА), призначений для кількісного визначення антитіл IgG до Правцевого анатоксину у плазмі та сироватці людини. Тільки для діагностики in vitro.

B. ВСТУП

Правець викликається інфекцією бактерії *Clostridium tetani*, яка зазвичай зустрічається в ґрунті, пилу та гною. Правець зустрічається у всіх частинах світу, але найчастіше зустрічається в жарких і вологих кліматичних зонах, де ґрунт містить багато органічної речовини. Бактерії зазвичай проникають через пошкодження на шкірі, наприклад, порізану або проколоту рану забрудненим предметом. Вони виробляють токсини, які перешкоджають скороченням м'язів, що призводить до типових симптомів. Діагноз ґрунтується на наявних ознаках і симптомах. Хвороба не поширюється між людьми. Інфекцію можна запобігти шляхом належної імунізації за допомогою інактивованої вакцини проти правцевого анатоксину. У тих, хто має значну рану і має менше трьох доз вакцини, рекомендована як імунізація, так і імуноглобулін проти правця. У тих, хто інфікований правцем, використовується імуноглобулін або, якщо його немає, внутрішньовенний імуноглобулін (IVIG).

Визначення IgG до правцевого токсину є досить важливим для прийняття рішення про проведення активної чи пасивної вакцинації чи ні.

C. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті нативним інактивованим правцевим анатоксином. Тверду фазу спочатку обробляють розведеним зразком, і антигени захоплюють IgG до правцевого анатоксину, якщо він присутній.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка у 2-й інкубації виявляються зв'язані проти правцевого анатоксину IgG шляхом додавання поліклональних специфічних антитіл до hlgG, мічених пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, який пропорційний кількості антитіл IgG до правцевого анатоксину, присутніх у зразку. Калібрувальна крива, відкалібрована відповідно до 1-го міжнародного стандарту ВООЗ для імуноглобуліну правця людини, код NIBSC TE-3, робить можливим кількісне визначення антитіл IgG у пацієнта.

D. КОМПОНЕНТИ

Стандартний набір містить достатню кількість реагентів для проведення 96 тестів.

1. Мікропланшет MICROPLATE

12 смужок x 8 відривних лунок, покритий інактивованим природним правцевим анатоксином у присутності бічачих білків.

Планшети запаковані в пакет з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакет з осушувачем і зберігайте при 2..8°C (°C).

2. Калібрувальна крива: CAL N°...

5x2 мл/флакон (ml/vial). Готова до використання та кодована кольором, Стандартна крива отримана з позитивної плазми людини на IgG правцевого анатоксину та титрована за 1-м міжнародним стандартом ВООЗ TE-3 у діапазоні:

CAL1 = 0 ВООЗ МО/мл (WHO IU/ml)

CAL2 = 0.1 ВООЗ МО/мл (WHO IU/ml)

CAL3 = 0.5 ВООЗ МО/мл (WHO IU/ml)

CAL4 = 1.0 ВООЗ МО/мл (WHO IU/ml)

CAL 5 = 5.0 ВООЗ МО/мл (WHO IU/ml)

Містить білки сироватки людини, 2% казеїну, 10 мМ (mM) На-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 10% фетальної телячої сироватки (FCS), 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Стандарти синього кольору.

3. Позитивна контрольна сироватка: POS CONTROL

1x2 мл. Готовий до використання. Основа сироватки людини, яка реагує на антитіла IgG до правцевого анатоксину, відкалібрована на 1.0 ± 20% ВООЗ 1-го міжнародного стандарту TE-3. Містить 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцин-сульфату та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Позитивна контрольна сироватка має **зелене кодування**.

4. Концентрат буферу для промивання: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшку (ml/bottle). 20-кратний концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буферу pH 7.0 +/-0.2 і 0.05% Твін 20 та 0.045% Proclin 300.

5. Ферментний кон'югат : CONJ

2 x 8 мл/флакон (ml/vial). Розчин готовий до використання та кодується **червоним кольором**. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому поліклональні антитіла до IgG людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) трис-буфер pH 6.8 +/-0.1, 0.045% ProClin 300, 0.02 мг/мл (mg/ml) гентаміцин-сульфату як консерванти та 0.01% червоного харчового барвника.

6. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). **Чорний флакон**. Містить 50 мМ (mM) цитрат-фосфатний буфер pH 3.5-3.8, 0.03% тетраметилбензидин (або ТМБ) і 0.02% перекис водню (або H₂O₂), та 4% диметилсульфоксиду.

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

7. 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)

8. Розчинник для зразка: DILSPE

2x60 мл/флакон (ml/vial). Містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) На-цитратного буферу pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Реагент позначений **синім кольором**.

9. Ущільнювальна фольга для планшета 2 шт.

10. Вкладиш інструкції 1 шт.

Додатковий метод (див. відповідний розділ):

Калібратор 6: CAL 6

1x2.0 мл/флакон (ml/vial). **8 ВООЗ МО/мл (WHO IU/ml)**. Готовий до використання (розведений 1:250), кодований **світло-жовтим кольором**, калібратор отриманий із плазми людини, позитивний на IgG правцевого анатоксину та титрований за 1-м міжнародним стандартом ВООЗ TE-3. **Примітка:** Використовувати тільки в Додатковому методі.

Калібратор 7: CAL 7

1x2.0 мл/флакон (ml/vial). **20 ВООЗ МО/мл (WHO IU/ml)**. Готовий до використання (розведений 1:250), кодований **темно-жовтим кольором**, калібратор отриманий із плазми людини, позитивний на IgG правцевого анатоксину та титрований за 1-м міжнародним стандартом ВООЗ TE-3. **Примітка:** Використовувати тільки в Додатковому методі.

Важлива примітка: Тільки за спеціальним запитом Dia.Pro може надати реагенти для 480 тестів, як зазначено нижче:

Мікропланшет	5
Калібрувальна крива	5x10 мл/флакон (ml/vial)
Позитивна контрольна сироватка	1x10 мл/флакон (ml/vial)
20-х конц. Промивного буфера	2x150 мл/пляшки (ml/bottles)
Ферментний кон'югат	2x40 мл/флакон (ml/vial)
Хром/Субстрат	2x40 мл/пляшку (ml/bottle)
Сірчана кислота	2x40 мл/пляшки (ml/bottles)
Розчинник для зразка	4x150 мл/пляшку (ml/bottle)
Калібратор 6	1x10 мл/флакон (ml/vial)

Калібратор 7 Герметичні плівки Інструкція	1x10 мл/флакон (ml/vial) 10 1
К-сть тестів	480
Код	TETG.CE.480

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (1000 мкл (µl), 100 мкл (µl) та 10 мкл (µl) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу ЕІА (подвійної дистиляції або деіонізації, оброблена деревним вугіллям, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
6. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
7. 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. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без талку 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.
3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
4. 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 (ТМБ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
5. Після отримання, зберігайте набір при температурі 2.8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на будь-яку істотну втрату активності до 6 використань пристрою та до 3 місяців.
11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитися на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікації Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
13. 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).

14. 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.
15. Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
16. 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.

Г. 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. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
3. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок або мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
4. 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 вийняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморозувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
5. Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2.000 об/хв протягом 20 хв або фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8µm для очищення зразка перед тестуванням.

Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету нагрітися до кімнатної температури (приблизно 1 год). Перевірте, щоб осушувач не став темно-зеленим, що вказує на дефект виробництва. У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий мішечок з осушувачем, щільно застібнути на блискавку і зберігати при +2°..8°C (°C). Після першого відкриття невикористані смужки стабільні доки індикатор вологості всередині пакета з осушувачем не зміниться з жовтого на зелений.

Калібрувальна крива:

Готові до використання стандарти. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Примітка: CAL 6 та CAL 7 повинні використовуватися тільки для Додаткового Методу.

Позитивна контрольна сироватка:

Готовий до використання стандарт. Ретельно перемішайте на вортексі перед використанням.

Концентрат Промивного буфера:

Весь вміст концентрованого розчину необхідно розбавити 20х відстильованою водою до 1200 мл (ml) і обережно перемішати зверху донизу перед використанням. Оскільки у флаконі можуть бути присутні кристали солі, подбайте про розчинення всього вмісту під час приготування розчину.

Під час приготування уникайте спінювання, оскільки наявність бульбашок може вплинути на ефективність циклів промивання.

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

Ферментний кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Уникайте забруднення рідини окислювальними хімічними речовинами, пилом або мікробами.

Якщо цей компонент необхідно перенести, використовуйте тільки пластикові та, якщо 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 зразка:

Готовий до використання компонент. Перед використанням обережно перемішати 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 Н-фрази:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні Р-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.

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%. Дезактивацію розливів або залишків компонентів набору також слід проводити регулярно.

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 водяні 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 вносить потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати 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 ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для

бланкування. Його стандартні характеристики 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, перелийте розчин у відповідні контейнери та промаркуйте їх такою ж етикеткою, що вилучили з оригінального флакону. Це є важливим, щоб невідповідності вмісту флаконів під час їх перенесення. Коли тестування закінчено, поверніть вторинні марковані контейнери до 2..8°C (°C), щільно закривши 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.

3. Переконайтеся, що Хромоген (ТМБ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.

4. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролило рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.

5. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.

6. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (приблизно 1 год), а потім обережно перемішайте на вортексі усі рідкі реагенти.

7. 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.

8. Переконайтеся, що ІФА зчитувач увімкнено або переконайтеся, що він увімкнений принаймні за 20 хвилин до зчитування.

9. Якщо використовується автоматизована робоча станція, увімкніть, перевірте налаштування та переконайтеся, що ви використовуєте правильний протокол аналізу.

10. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.

11. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.

12. У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівника.

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.

Ретельно перемішайте усі рідкі компоненти на вортексі, а потім виконайте наступне:

A. Стандартний метод:

Призначений для визначення ступеня захисту від правцевої інфекції до або після вакцинації.

1. Розведіть зразки 1:101 у відповідно визначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (μl) Розчинника для зразка + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте Калібратори та Контролі сироватки, оскільки вони готові до використання.
2. Розмістіть необхідну кількість Мікролунок у тримачі. Залишіть лунки A1 та B1 порожніми для бланкування.
3. Потім внесіть 100 мкл (μl) Калібраторів у двох примірниках та 100 мкл (μl) Позитивної контрольної сироватки у двох примірниках.
4. Потім додайте 100 мкл (μl) розведених зразків у кожну правильно ідентифіковану лунку. Рекомендується додавати їх у двох примірниках для більш точної кількісної оцінки IgG.
5. Інкубувати планшет **протягом 60 хв при +37°C (°C)**.

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

6. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, доставивши та аспірувавши 350 мкл/лунку (μl/vial) розведеного промивного розчину, як повідомлялося раніше (розділ I.3).
7. Внесіть 100 мкл (μl) Ферментного кон'югату у кожну лунку, окрім A1 + B1, та накрийте герметичною плівкою. Перевірте, щоб цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, крім A1 та B1.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, заповненим Ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

8. Інкубувати мікропланшет **протягом 30 хв при + 37°C (°C)**.
9. Промити мікролунки як на етапі 6.
10. Внесіть 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включаючи бланк-лунки A1 та B1. Потім інкубуйте мікропланшет **протягом 15 хвилин при температурі 18 -25°C (°C) у темряві**.

Важлива примітка: не піддавайте сильному прямому світлу, оскільки може утворитися високий фон.

11. Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти в усі лунки, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 10. Додавання кислоти перетворить позитивні стандарти та позитивні зразки з синього кольору на жовтий.
12. Виміряйте інтенсивність кольору розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.5, за допомогою зчитувача мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язково), бланкуючи інструмент на A1 чи на B1, або на обидвох.

B. Додатковий метод:

Призначений для тестування зразків з високими титрами за допомогою автоматичного пристрою.

1. Використовуйте готові до використання додаткові стандарти при 0-8-20 МО/мл (IU/ml).
2. Розведіть зразки 1:250 Розчинником для зразків. Зразки слід додавати в одному примірнику.

Важлива примітка: Якщо розведення виконується за допомогою автоматичного пристрою, налаштуйте інструмент так, щоб він взяв 240 мкл (μl) Розчинника для зразка, а потім 10 мкл (μl) зразка, потім все помістити в планшет для розведення та належним чином перемішати (розведення 1:25). Після цього аспіруйте за допомогою інструменту 90 мкл (μl) розчинника для зразка, а потім 10 мкл (μl) розведеного зразка 1:25 (розведення 1:10). Додайте у відповідну лунку для аналізу та перемішайте (кінцеве розведення 1:250).

3. Додайте 100 мкл (μl) стандартів 0-8-20 МО/мл (IU/ml), можливо, в двох примірниках. Стандарти готові до використання: не розводити їх.
4. Інкубувати планшет для аналізу протягом **30 хв при кімнатній температурі**.
5. Промити як описано у стандартній процедурі.

6. Додати 100 мкл (μl) готового до використання Ферментного кон'югату.
7. Інкубувати протягом **30 хв при кімнатній температурі**.
8. Промити як на етапі 5.
9. Дійте так, як зазначено у стандартному методі в пункті 10 і далі.

Важлива примітка для контролю якості:

Правильна роздача зразків і реагентів важлива, щоб уникнути, зокрема, хибнонегативних результатів через відсутність зразка або реагенту. Рекомендується наступна процедура перевірки видачі: Додавання розведеного зразка (синій), кон'югату (червоний) і хромогену/субстрату (біло-блакитний) перевіряється зчитуванням лунок при 405 нм (nm) відповідно до того, що визначено в наступній таблиці:

Етапи (додавання)	Доданий об'єм	Перевірка (зчитування)
Порожня лунка	////	ОЩ405 нм (nm) < 0.070
Розведений зразок	100 мкл (μl)	ОЩ405 нм (nm) ≥ 0.140
Кон'югат	100 мкл (μl)	ОЩ405 нм (nm) ≥ 0.180
Хромоген/Субстрат	100 мкл (μl)	ОЩ405 нм (nm) ≥ 0.050

У разі невідповідності, не продовжуйте далі та перевірте прилад і об'єми реагентів.

Загальні важливі зауваження:

1. Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
2. Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.
3. Позитивна контрольна сироватка не впливає на підрахунок результатів тесту. Сироватку позитивного контролю можна використовувати лише тоді, коли керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.

N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Стандартний метод	Операції
Калібратори та Позитивна контрольна сироватка Розведені зразки 1:101	100 мкл (μl)
1-а інкубація	100 мкл (μl)
Температура	60 хв 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	100 мкл (μl)
Температура	30 хв 37 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. Замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/Н ₂ О ₂	100 мкл (μl)
3-я інкубація	15 хв
Температура	18 - 25 °C (°C)
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm) /620-630 нм (nm)

Додатковий метод	Операції
Готові до використання Стандарти 0-8-20 МО/мл (IU/ml) Розведені зразки 1:101	100 мкл (μl)
1-а інкубація	100 мкл (μl)
Температура	30 хв 18-25 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. Замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
2-а інкубація	100 мкл (μl)
Температура	30 хв 18 - 25°C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. Замочування АБО

	6 циклів без замочування
TMB/H ₂ O ₂	100 мкл (μl)
3-я інкубація	15 хв
Температура	18 – 25 °C (°C)
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm) /620-630 нм (nm)

Нижче у таблиці наведено приклад схеми видачі для Стандартного методу:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S2									
B	BLK	CAL4	S2									
C	CAL1	CAL5	S3									
D	CAL1	CAL5	S3									
E	CAL2	POSCS	S4									
F	CAL2	POSCS	S4									
G	CAL3	S1	S5									
H	CAL3	S1	S5									

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратори POSCS = Позитивна контрольна сироватка S = Зразок

Нижче у таблиці наведено приклад схеми видачі для Додаткового методу:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S1										
B	BLK	S2										
C	CAL1	S3										
D	CAL1	S4										
E	CAL6	S5										
F	CAL6	S6										
G	CAL7	S7										
H	CAL7	S8										

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратори S = Зразок

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації здійснюється на контролях щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу відповідають очікуванням.

Переконайтеся, що такі дані збігаються:

Стандартний метод:

Перевірка	Вимоги
Бланк-лунка	середнє ОЩ 450 нм (nm) < 0.050
CAL1 0 МО/мл (IU/мл)	середнє ОЩ 450 нм (nm) < 0.050 після бланкування
CAL 2 0.1 МО/мл (IU/мл)	середнє ОЩ 450 нм (nm) ≥ 0.150 після бланкування
CTRL POS	середнє ОЩ 450 нм (nm) = середнє ОЩ 450 нм (nm) CAL4 1 МО/мл (IU/мл) ± 20%

Додатковий метод:

Перевірка	Вимоги
Бланк-лунка	Середнє ОЩ 450 нм (nm) < 0.050
CAL1 0 МО/мл (IU/мл)	Середнє ОЩ 450 нм (nm) < 0.050 після бланкування
CAL7 20 МО/мл (IU/мл)	середнє ОЩ 450 нм (nm) ≥ 1.400 після бланкування

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

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі та виконайте наступне:

Проблема	Перевірка
Бланк-лунка >0.050 ОЩ 450 нм (nm)	1. щоб розчин Хромогену/Субстрату не був забруднений під час аналізу
CAL1 0 МО/мл (IU/мл) >0.050 ОЩ 450 нм (nm)	1. ефективність вошера 2. що використано відповідний розчин для промивання

Перекладач Романюк Н. П.

після бланкування	3. не було допущено жодної помилки в процедурі аналізу (видача позитивного калібратора замість негативного; 4. що жодного забруднення негативного калібратора або лунок, не відбулося через розливи позитивних зразків або ферментного кон'югату; 5. що мікропіпетки не були забруднені 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забруднені
Проблема	Перевірка
CAL2 0.1 МО/мл (IU/мл) ОЩ 450 нм (nm) < 0.150	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний калібратор); 3. що налаштування промивання правильні; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення калібратора. 5. що не вийшов термін придатності набору
CAL7 20 МО/мл (IU/мл) ОЩ 450 нм < 1.400	
Позитивна контрольна сироватка POSCS Відрізняється від очікуваного значення	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний калібратор); 3. що налаштування миття правильні; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення стандарту. Якщо виявлено помилку, то аналіз слід повторити після усунення такої помилки. Якщо помилки немає, то продовжуйте далі: отримано значення вище +/-20%: у цьому випадку тест є недійсним, і необхідно викликати службу підтримки клієнтів DiaPro.

Якщо виникла будь-яка з перерахованих вище проблем, повідомте про проблему керівнику для подальших дій.

Важлива примітка:

Аналіз слід виконувати, як етап зчитування, описаний у розділі M, пункт 12.

Р. РЕЗУЛЬТАТИ

Якщо тест виявляється дійсним, скористайтеся затвердженою програмою підгонки кривої, щоб накреслити калібрувальну криву на основі значень, отриманих при зчитуванні при 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) (пропонується 4-параметрична або квадратична інтерполяція). Потім за калібрувальною кривою розраховують концентрацію IgG антитіла до правцевого анатоксину у зразках.

Приклад типової калібрувальної кривої після бланкування:

CAL1 0 МО/мл (IU/мл)	= 0.005 ОЩ 450 нм (nm)/620-630 нм (nm)
CAL2 0.1 МО/мл (IU/мл)	= 0.180 ОЩ 450 нм (nm) /620-630 нм (nm)
CAL3 0.5 МО/мл (IU/мл)	= 1.000 ОЩ 450 нм (nm) /620-630 нм (nm)
CAL4 1.0 МО/мл (IU/мл)	= 1.800 ОЩ 450 нм (nm) /620-630 нм (nm)
CAL5 5.0 МО/мл (IU/мл)	= 2.500 ОЩ 450 нм (nm) /620-630 нм (nm)

Не використовувати значення, щоб генерувати стандартну криву для аналізу.

Додатковий метод:

Використовуйте програму підгонки «точка-точка», щоб накреслити калібрувальну криву зі значень, отриманих при зчитуванні при 450 нм/620-630 нм.

Потім за калібрувальною кривою обчислюють концентрацію антитіла IgG до правцевого анатоксину у зразках.

Приклад типової калібрувальної кривої після бланкування:

CAL1 0 МО/мл (IU/мл)	= 0.010
CAL6 8 МО/мл (IU/мл)	= 1.500
CAL7 20 МО/мл (IU/мл)	= 2.600

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У наступній таблиці показано, як інтерпретувати результати:

МО/мл (IU/ml) знайдено	Інтерпретація
<0.1	Рекомендується імунізація
0.11 – 0.5	Необхідно відмінити щеплення
0.5 – 1.0	Через 1-2 роки підлягає контролю
1.1 – 5.0	Через 2-4 роки підлягає контролю
>5.0	Через 4-8 років підлягає контролю

Важливі примітки:

- Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідальної лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
- У будь-якому випадку рішення про імунізацію пацієнта має приймати лікар, а не лабораторія.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії в іншу установу, необхідно звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Межа виявлення:

Межа виявлення (аналітична чутливість) була розрахована як середня ОЩ450 нм (nm) /620-630 нм (nm) CAL 0 МО/мл (IU/ml) + 5 СВ. Аналіз показує межу виявлення 0.035 МО/мл (IU/ml) при використанні стандартного методу. Однак для діагностичних показників, про які повідомляється нижче, було використано значення **cut-off 0.1 МО/мл (IU/ml)**.

Діагностична чутливість:

Діагностична чутливість була перевірена в дослідженні оцінки ефективності на панелі зразків, що склалися з приблизно 500 сироваток, які були класифіковані як позитивні за допомогою референсного ІФА з маркуванням SE.

Аналіз у такому дослідженні показав значення кореляції 100% зі стандартним методом.

Діагностична специфічність:

Діагностична специфічність була визначена в тому самому оцінюванні на панелі негативних зразків, що склалися з приблизно 200 сироваток, підтверджених, що є негативними за допомогою контрольного ІФА з маркуванням SE.

У такому дослідженні було виявлено загальне значення кореляції в 100%.

Для визначення значення специфічності використовували як плазму, отриману за різними стандартними методиками приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватку. Інтерференцій з боку інших антитіл не спостерігалося.

Точність:

Розраховували стандартним методом на CAL2 (0.1 МО/мл (IU/ml)) і на CAL4 (1 МО/мл (IU/ml)), досліджених у 48 повторях у трьох окремих циклах для трьох партій. Знайдено значення КВ% від 3 до 20.

S. ОБМЕЖЕННЯ

Бактеріальне забруднення або теплова інактивація зразка може вплинути на значення поглинання зразків з подальшою зміною визначення IgG.

Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати після розмороження, можуть давати дещо помилкові результати.

Гемоглобін > 10 мг/мл (mg/ml), білірубін > 0.5 мг/мл (mg/ml) і тригліцериди > 5.0 мг/мл (mg/ml) можуть дати помилкові результати.

ЛІТЕРАТУРА

Atkinson, William (May 2012). *Tetanus Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases* (12 ed.). Public Health Foundation. pp. 291–300. ISBN 9780983263135. Retrieved 12 February 2015.

"Tetanus Symptoms and Complications". *cdc.gov*. January 9, 2013. Retrieved 12 February 2015.

"Tetanus Causes and Transmission". *www.cdc.gov*. January 9, 2013. Retrieved 12 February 2015.

"Tetanus For Clinicians". *cdc.gov*. January 9, 2013. Retrieved 12 February 2015.

GBD 2013 Mortality and Causes of Death, Collaborators (17 December 2014).

"Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013". *Lancet*. 385 (9963): 117–71. doi:10.1016/S01406736(14)61682-2. PMC 4340604. PMID 25530442.

"Tetanus" (PDF). *CDC Pink Book*. Retrieved 2007-01-26.

Vandelaer, J.; Birmingham, M.; Gasse, F.; Kurian, M.; Shaw, C.; Garnier, S. (July 28, 2003). "Tetanus in developing countries: an update on the Maternal and Neonatal Tetanus Elimination Initiative". *Vaccine*. 21 (24): 3442–5. doi:10.1016/S0264-410X(03)00347-5. PMID 12850356.

Brauner, J. S.; Vieira, S. R.; Bleck, T. P. (July 2002). "Changes in severe accidental tetanus mortality in the ICU during two decades in Brazil". *Intensive Care Medicine*. 28 (7): 930–5. doi:10.1007/s00134-002-1332-4. PMID 12122532.

Farrar, J. J.; Yen, L. M.; Cook, T.; Fairweather, N.; Binh, N.; Parry, J.; Parry, C. M. (September 2000). "Tetanus". *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 69 (3): 292–301. doi:10.1136/jnnp.69.3.292. PMC 1737078. PMID 10945801.

"Maternal and Neonatal Tetanus Elimination by 2005" (PDF). *UNICEF*. November 2000. Retrieved 2007-01-26.

"Elimination of Maternal and Neonatal Tetanus". *UNICEF*. Retrieved 17 February 2014.

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

