

Інструкція з використання

Малярія скринінг ІФА

Каталожний No. E-MLS-K37



IVD CE



2^o 8^o

RD-RatioDiagnostics	Phone: + 49 (0) 69 / 7807 4942
Westerbachstraße 47	Fax: + 49 (0) 69 / 7807 4998
60489 Frankfurt	Email: info@rd-labs.com
Німеччина	www.RD-LABS.com

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19
А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18,

info@novamedline.com, www.novamedline.com

ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Набір RD-RatioDiagnostics E-MLS-K37 малярія скринінг ІФА призначений для виявлення антитіл до 3 основних видів паразиту малярії в сироватці та плазмі людини.

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ТА ПОЯСНЕННЯ

Малярія - одна з найпоширеніших хвороб у світі. Більше половини світового населення живе в заражених малярією районах. Понад 200 мільйонів випадків щорічно призводять до 3 мільйонів смертей щороку; більшість з яких - у маленьких дітей. У неендемичних районах це одне з найважливіших імпорتنних захворювань, що призводить до ряду смертей у пізно діагностованих або не підозрюваних випадках щороку. Хвороба викликана найпростішими з роду плазмодій, що передаються при укусі самки комара *Anopheles*. Існує чотири види, що викликають малярію у людини: *P.falciparum*, *P.vivax*, *P* та малярія. Захворювання також може передаватися при переливанні зараженої крові. Потрапляючи в кров, спорозоїт пробивається до печінки, де протягом наступних 2 тижнів виробляються мерозоїти. Вони потрапляють у кров, де вони вторгуються в еритроцити і виробляють більше мерозоїтів, змушуючи клітини розриватися. Саме цей розрив відповідає за клінічні симптоми. З чотирьох видів *P. falciparum* є найпоширенішим і найбільш вірулентним, викликаючи більшість смертей, пов'язаних з малярією. *P. vivax* - наступна найпоширеніша причина малярії. Люди, інфіковані *Plasmodium spp.* утворюють у відповідь антитіла. Набір RD-RatiDiagnostics малярія ІФА призначений для виявлення антитіл, що виникають у суб'єктів, інфікованих *P.spc*

ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набори для скринінгу малярії E-MLS-K37 використовують чотири рекомбінантні антигени в сендвіч-тесті, щоб створити тест, який є високоспецифічним і чутливим. Антигени виявляють специфічні для IgG, IgM та IgA *P.falciparum*, *P.vivax* та *P.malariae*, що дозволяє тесту виявляти антитіла на всіх стадіях зараження. Пластикові лунки покриті сумішшю рекомбінантних антигенів чотирьох *spc.* паразит малярії. Антигенна подібність між видами плазмодію означає, що можна виявити антитіла до всіх видів. Специфічні антитіла в зразках сироватки або плазми поєднуються з цими антигенами та з тими самими антигенами, кон'югованими з пероксидазою хрому, коли кон'югат додають у лунку, в якій зразок інкубували. Після видалення непрореагованого матеріалу промиванням наявність зв'язаного ферменту, що вказує на присутність у зразку специфічних антитіл, виявляється через зміну кольору субстрату ТМБ. Інтенсивність забарвлення порівнюють з інтенсивністю забарвлення в контрольних лунках для визначення присутності або відсутності специфічного антитіла

РЕАГЕНТИ

Набір RD-RatioDiagnostics малярія скринінг ІФА містить достатньо реагенту для 96 лунок. Кожен набір містить такі реагенти :

Матеріали надані	кількість	Каталожний номер
Мікропланшет, покритий антигеном	Один планшет	E-MLS-10
Промивний концентрат	Одна пляшка	E-WSL-30
ТМБ субстрат	Одна пляшка	E-TMB-08
Негативний контроль	Один флакон	E-MLS-01
Позитивний контроль	Один флакон	E-MLS-02
кон'югат	Одна пляшка	E-MLS-20

Стоп розчин	Одна пляшка	E-STP-10
-------------	-------------	----------

ЗБІР ЗРАЗКІВ І ОБРОБКА

Слід використовувати сироватку та дотримуватися звичайних запобіжних заходів щодо проколювання вени. Зразки можна зберігати при 2-8 ° С протягом 2 днів. Триваліше зберігати при –20 ° С. Не використовуйте гемолізовані або ліпемічні зразки. Уникайте повторного заморожування та розморожування зразків.

ПІДГОТОВКА ДО АНАЛІЗУ

Для успішного використання продукту необхідне глибоке розуміння цієї інструкції. Надійні результати будуть отримані лише за допомогою точних лабораторних методів та точно слідуючи інструкції, вкладеній в упаковку. Перед використанням доведіть усі реактиви та зразки до кімнатної температури (~ 25 ° С). Ретельно перемішайте реактиви та зразки перед використанням обережною інверсією. Не змішуйте різні партії будь-яких компонентів набору в рамках окремого аналізу. Не використовуйте будь-який компонент після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці. Неповне миття негативно вплине на результат та точність аналізу. Щоб мінімізувати можливий дрейф аналізу через зміну часу інкубації субстрату, слід подбати про додавання стоп розчину в лунки в однаковому порядку та швидкості для додавання розчину хромогену ТМБ. Уникайте мікробного забруднення реактивів, особливо кон'югату, промивного буфера та розріджувача. Уникайте забруднення розчину хромогену ТМБ кон'югатом. Для кожного реактиву використовуйте чистий одноразовий наконечник піпетки. Уникайте піпеток з металевими деталями. Ємності та напівавтоматичні наконечники для піпеток, що використовуються для кон'югату та ТМБ, можуть бути використані повторно за умови їх ретельного промивання дейонізованою / дистильованою водою та сушіння до та після кожного використання. Фермент, що використовується як мітка, інактивується киснем і дуже чутливий до мікробного забруднення, азиду натрію, хлористоводневої кислоти та ароматичних хлорвуглеводнів, які часто містяться в лабораторних запасах води. Використовуйте високоякісну воду. Уникайте впливу реактивів надмірним теплом або сонячним світлом під час зберігання та інкубації.

ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

Для використання *in vitro*

Слід дотримуватися таких універсальних належних лабораторних практик: не їжте, не пийте, не паліть і не застосовуйте косметику там, де обробляють імунодіагностичний матеріал. Не піпетувати через рот. Надягайте лабораторні халати та одноразові рукавички під час роботи з імунодіагностичним матеріалом. Після цього ретельно вимийте руки. Закрийте робочу зону одноразовим абсорбуючим папером. Негайно витріть розлиті плями та знезаразити уражені поверхні. Уникайте утворення аерозолів. Забезпечити достатню вентиляцію. Обробляйте та утилізуйте всі реактиви та матеріали відповідно до чинних норм.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: ПОТЕНЦІАЛЬНИЙ БІОЛОГІЧНО НЕБЕЗПЕЧНИЙ МАТЕРІАЛ

Цей набір може містити деякі реактиви, виготовлені з вихідним матеріалом людини (наприклад, сироваткою або плазмою) або використані разом із вихідним матеріалом людини. Матеріал у цьому наборі був протестований методами, рекомендованими СЕ, і виявлено, що він не реагує на антитіла до ВІЛ-1/2, HCV та HBsAg. Жоден доступний метод випробувань не може дати повних гарантій усунення потенційного ризику для біологічної безпеки. Обробляйте всі реактиви та зразки пацієнтів на рівні Біобезпеки 2, як рекомендується для будь-якого потенційно інфекційного людського матеріалу в Посібнику Центрів контролю захворювань / Національний інститут охорони здоров'я "Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях", 4-е видання, квітень 1999 року.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ:

Деякі реактиви цього набору містять азид натрію як консервант у концентраціях нижче нормативної межі <0,1%. Концентрований азид натрію, хоча і значно розбавлений, подразнює шкіру та слизові оболонки і може реагувати зі свинцевим та мідним водопроводом, утворюючи вибухонебезпечні азиди металів, особливо якщо накопичуються. Крім того, ТМБ та сірчана кислота у концентрованих кількостях також подразнюють шкіру та слизові оболонки. Ці речовини знаходяться у розведеному вигляді, і тому можуть значно мінімізувати

ризика впливу, але не повністю. Забезпечити достатню вентиляцію. Уникайте контакту зі шкірою, очима та одягом.

У разі контакту з будь-яким із цих реагентів ретельно промити водою та звернутися до лікаря. Утилізуйте всі небезпечні реагенти, промиваючи великими обсягами води, щоб запобігти накопиченню хімічної небезпеки в сантехнічній системі. Для отримання додаткової інформації щодо небезпечних речовин у наборі, будь-ласка, зверніться до специфічних паспортів безпеки (DSDS) за запитом.

МАТЕРІАЛИ НЕ НАДАНИ

- Рідер мікропланшетів для вимірювання поглинання при 450 нм
- Дейонізована / дистильована вода
- Точна піпетка для подачі 10 мкл 100 мкл і 1 мл
- Напівавтоматична піпетка для подачі 100 мкл
- Автоматичний вошер для мікропланшетів
- Абсорбуючий матеріал для промокання стріпів
- Інкубатор

НАДАНИ РЕАГЕНТИ

Набір RIS-RatioDiagnostics Malaria Screen ELISA містить достатньо реагенту для 96 лунок. Кожен комплект містить наступні реактиви

Матеріали надані	кількість	Каталожний номер
Мікропланшет, покритий антигеном	Один планшет	E-MLS-10
Промивний концентрат	Одна пляшка	E-WSL-30
ТМБ субстрат	Одна пляшка	E-TMB-08
Негативний контроль	Один флакон	E-MLS-01
Позитивний контроль	Один флакон	E-MLS-02
кон'югат	Одна пляшка	E-MLS-20
Стоп розчин	Одна пляшка	E-STP-10

Стріпи мікропланшета з антигенним покриттям:

Один тримач стріпів, що містить 12x8 (96) лунок мікропланшета, покритих антигеном малярії рекомбінантним. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності. Вийміть тримач та стріпи, які будуть використовуватися, з упаковки з фольги та покладіть невикористані стріпи в поліетиленовий пакет з силікагелем, видаліть повітря та ущільніть, натиснувши на кришку. Після відкриття продукт стабільний протягом 4 тижнів при температурі 2-8 ° С.

Концентрат для промивання:

Одна пляшка, 100 мл, що містить сольовий розчин, забуферений фосфатом, концентрований 10-кратний, що містить 0,5 об.% Бридж за об'ємом (мас. / Об.). Перед використанням розбавити дейонізованою / дистильованою водою. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

Контролі малярія:

Два флакони, негативний (1 мл), та позитивний, сироватки людини, розчинені в буфері.

Негативний контроль і позитивний контроль необхідно тестувати два рази при кожному прогоні.

Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

Кон'югат :

Одна пляшка, 6 мл. Готовий до використання кон'югат. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

ТМБ - субстрат:

Одна пляшка, 6 мл, що містить тетраметилбензидин (ТМБ) і перекис водню, стабілізовані в цитратному буфері, рН 3,8. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

Стоп - розчин:

Одна пляшка, 6 мл, що містить 0,5 М H₂SO₄ у розчині. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ:**Промивний розчин:**

Перед використанням розбавте 1:10 дейонізованою / дистильованою водою.

Стріпи мікропланшету:

Виберіть кількість стріпів з покриттям, необхідних для аналізу. Невикористані лунки слід помістити в пакет, що закривається, з пакетом осушувача. Пакет потрібно закрити повторно, щоб захистити від вологи.

Процедура аналізу:

Усі зразки та реагенти повинні досягати кімнатної температури (~25 ° С) перед використанням.

Контролі аналізу :

Негативний і позитивний контроль необхідно тестувати два рази з кожним циклом.

Процедурні примітки.

Промивання повинно бути ретельним, з повним заповненням та спороженням лунок на кожному циклі.

Процедура:

Додайте 50 мкл готового до використання негативного та позитивного контролю у кожен визначену лунку (дублікат) і додайте 50 мкл зразків в інші лунки. Інкубуйте при 37 ° С протягом 45 хвилин.

Промивання

Аспіруйте і промивайте кожен лунку чотири (6) рази протягом 30 секунд промивним розчином за допомогою автоматичного вошера для мікропланшетів або вручну за допомогою дозатора. Протріть і висушіть, перевернувши планшет на абсорбуючий матеріал.

ПРИМІТКА: Настійно рекомендується використовувати автоматичний вошер для мікропланшетів. Неповне миття негативно вплине на точність аналізу. Якщо мийка для мікропланшетів недоступна, (а) повністю

відсмоктуйте рідину з кожної лунки, (b) додавайте 0,35 мл промивного розчину в кожну лунку та (c) повторіть кроки (a) та (b) шість разів.

Інкубація кон'югату

Додайте 50 мкл готового до використання кон'югату в кожну лунку. при 37 ° С протягом 45 хвилин.

Промивання

Аспіруйте і промивайте кожну лунку чотири (б) рази протягом 30 секунд промивним розчином за допомогою автоматичного вошера для мікропланшетів або вручну за допомогою дозатора. Протріть і висушіть, перевернувши планшет на абсорбуючий матеріал.

ПРИМІТКА: Настійно рекомендується використовувати автоматичний вошер для мікропланшетів. Неповне миття негативно вплине на точність аналізу. Якщо мийка для мікропланшетів недоступна, (a) повністю відсмоктуйте рідину з кожної лунки, (b) додавайте 0,35 мл промивного розчину в кожну лунку та (c) повторіть кроки (a) та (b) шість разів.

Субстрат ТМБ

Додайте 50 мкл ТМБ-субстрату в кожну лунку.

Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 30 хвилин у темряві.

Зупиніть розвиток кольорів

Додайте 50 мкл 0,5 М сірчаної кислоти в кожну лунку. (Синій колір змінюється на жовтий).

Прочитайте результати

Зчитування при 450 нм (A450) Використання референтного фільтру при 620 - 690 нм усуне наслідки подряпин, бульбашок тощо

Порогове значення

Обчислюється як середнє значення негативного контролю плюс 0,200 тобто

(негативний контроль 1 + негативний контроль 2)/2 + 0.200

Приклад: (0,030 + 0,025)/2 + 0,200

Порогове Значення = 0,027 + 0,200 = 0,227

РЕЗУЛЬТАТИ

Обчисліть середню абсорбцію для кожного контролю та невідомого.

ОГ 450 кожного негативного контролю повинен бути меншим або рівним 0,120. Якщо один контроль перевищує це значення, зчитування слід ігнорувати і розрахувати порогове значення з використанням двох інших. ОГ 450 кожного позитивного контролю повинна бути більшою або рівною 0,260.

Інтерпретація

Зразки із значенням A450, меншим за порогове значення, вважаються негативними методом ІФА малярія скринінг. Однак зразки, що знаходяться безпосередньо під межею (Пор. –10% A450), слід інтерпретувати з обережністю. Бажано провести повторну перевірку відповідних зразків у двох примірниках, коли дозволяють системи та лабораторні процедури. Повторно випробувані зразки, які знаходяться над граничним значенням принаймні в одному повторенні,

вважаються позитивними і їх слід дослідити далі. Зразки, які знаходяться нижче граничного значення в обох дублікатах, вважаються негативними.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ**1. Чутливість та специфічність**

Оціночне дослідження показало, що ІФА на малярійну діагностику РД має специфічність 100% та чутливість 95%

2. Точність

Дослідження в аналізі			
Кількість повторень 16	Сироватка 1	Сироватка 2	Сироватка 3
середнє	0,123	0,457	1,036
СВ	0,00	0,01	006
CV%	3,4	1,7	5,7
Дослідження між аналізами			
Кількість повторень 16	Сироватка 1	Сироватка 2	Сироватка 3
середнє	0,022	0,88	0,86
СВ	0,003	0,067	0,069
CV%	14,45	7,6	8,08

