

**НАБІР ІФА**  
**ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ**  
**IgA, СПЕЦИФІЧНИХ ДО**  
**МІКОБАКТЕРІАЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЬОЗУ, В**  
**ЛЮДСЬКІЙ СИРОВАТЦІ ТА ПЛАЗМІ**

**5110-8, ТВ IgA**

Каталог. №: 5110-8

Методика від 02-18-2013

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



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

**ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ**

<b>Кількість тестів</b>	<b>96 тестів</b>
<b>Тест</b>	<b>Mycobacterium Tuberculosis IgA ELISA</b>
<b>Метод</b>	<b>Імуносорбентний аналіз ІФА</b>
<b>Принцип</b>	<b>Непрямої ІФА: Планшет, покритий антигеном</b>
<b>Діапазон визначення</b>	<b>Якісний: Позитивний &amp; Негативний Контроль</b>
<b>Зразок</b>	<b>10 мкл</b>
<b>Специфічність</b>	<b>99 %</b>
<b>Чутливість</b>	<b>100 %</b>
<b>Загальний час</b>	<b>~ 50 хвилин</b>
<b>Термін придатності</b>	<b>12-14 місяців</b>

\*Лабораторні результати ніколи не можуть служити єдиною підставою для медичного висновку. Історія пацієнта та подальші дослідження повинні бути прийняті до уваги.

**ПРИЗНАЧЕННЯ**

Набір DAI Mycobacterial Tuberculosis IgA ELISA був розроблений для виявлення і кількісного визначення антитіл IgA, специфічних до Мікобактеріального Туберкульозу в сироватці та плазмі. Подальше застосування і в інших рідинах організму можливе. **Даний аналіз призначений тільки для in-Vitro діагностики.** Лабораторні результати ніколи не можуть бути єдиною основою для медичного висновку. Історія хвороби пацієнта та подальші випробування які також повинні прийматися до уваги.

**РЕЗЮМЕ І ОПИС (Див. оригінал інструкції).**

**ПРИНЦИП ТЕСТУ**

Набір DAI Mycobacterial Tuberculosis IgA ELISA заснований на принципі імуноферментного аналізу (ІФА). Mycobacterial Tuberculosis Антиген іммобілізований на поверхні смужок. Розведені сироватки або готові до використання стандарти піпетуються в лунки планшета. Відбувається зв'язування між антитілами IgA у сироватці крові та іммобілізованими антигенами Mycobacterial Tuberculosis. Після однієї години інкубації при кімнатній температурі планшет промивають розведеним миючим розчином для видалення незв'язаного матеріалу. Потім додається готовий до використання кон'югат анти-людських-IgA з пероксидазою та відбувається інкубація протягом 30 хвилин. Після наступного промивання піпетується Розчин субстрату (ТМВ) і відбувається інкубація протягом 20 хвилин, викликаючи розвиток синього кольору в лунках. Розвиток кольору припиняється додаванням стоп-розчину, який змінює колір з синього на жовтий. Кінцеве забарвлення вимірюють спектрофотометрично на довжині хвилі 450 нм. Концентрація антитіл IgA прямо пропорційна інтенсивності кольору.

**ОБМЕЖЕННЯ, ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ І ЗАГАЛЬНІ ЗАУВАЖЕННЯ**

- Тільки для in-Vitro використання! Не ковтати! Звичайні заходи лабораторної техніки безпеки, а також заборона їсти, пити і курити в лабораторії повинні бути дотримані.
- Всі сироватки та плазми або буфери на їх основі були протестовані відповідно на HBsAg, ВІЛ і ВГС визначеними методами і були виявлені негативними. Проте звичайні заходи обережності, такі як використання латексних рукавичок, повинні бути дотримані.
- Розливи сироватки та реагенту повинні бути видалені з дезінфікуючим розчином (наприклад, гіпохлорит натрію, 5%) і повинні бути утилізовані належним чином.

- Всі реагенти повинні бути доведені до кімнатної температури (18- 25 °C) перед проведенням тесту.
- Перед піпетуванням всі реагенти слід ретельно перемішати, обережно нахилиючи. Уникати утворення піни.
- Важливо піпетувати з постійними інтервалами, так, щоб всі лунки планшета знаходились в однакових умовах.
- При видаленні реагентів з уникати забруднення пробок. Подальшої можливої плутанини слід уникати. Вміст пляшок зазвичай чутливий до окислення, так що вони повинні бути відкриті тільки протягом короткого часу.
- Щоб уникнути переносу або перехресного забруднення, окремі одноразові наконечники для піпеток повинні бути використані.
- Не використовувати реагенти з інших партій, вони не повинні бути змішані між собою.
- Всі реагенти повинні бути використані до закінчення строку придатності.
- Відповідно до належної лабораторної практики (GLP) або згідно з ISO9001, всі лабораторні пристрої, що використовуються, повинні регулярно перевірятися на предмет їх достовірності і точності. Це відноситься, серед іншого, до мікротитраційних піпеток, обладнання для промивання або зчитування (ELISA-Читач).
- Контакт певних реагентів, насамперед стоп-розчину і субстрату, зі шкірою, очима і слизовою оболонкою слід уникати, так як можливо роздратування і хімічні опіки, і існує небезпека інтоксикації.

**РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ**

Зберігати компоненти набору при температурі 2-8 °C і не використовувати після закінчення терміну придатності, вказаного на зовнішній етикетці. Перед використанням усі компоненти привести до кімнатної температури (18-25 °C). Після використання, пластина повинна бути запечатана, пляшки закриті пробками і комплект повинен зберігатись при температурі 2-8 °C. Відкритий набір повинен бути використаний протягом трьох місяців.

Компоненти	Об'єм/Кількість
Смужки, попередньо вкриті антигеном до Mycobacterial Tuberculosis	12
Калібратор А (Негативний контроль)	2 мл
Калібратор В (Cut-Off Стандарт)	2 мл
Калібратор С (Слабкий позитивний контроль)	2 мл
Калібратор D (Позитивний контроль)	2 мл
Ферментний Кон'югат	15 мл
Субстрат	15 мл
Стоп-розчин	15 мл
Розчин для розведення зразків	60 мл
Промивний буфер (10X)	60 мл
Пластикові плівка	2
Пластиковий пакет	1

- 1. Мікротитрувальні смужки**  
12 смужок по 8 лунок кожна, вкриті сумішшю антигенів Mycobacterial Tuberculosis ((Рекомбінантні антигени Мікобактеріального туберкульозу, з 18, 36 і 40 кДа). Готові до використання.
- 2. Калібратор А (Негативний контроль)**  
2 мл, білковий розчин, розбавлений PBS, не містить антитіл IgA до Mycobacterial Tuberculosis. Доданий 0.01% Метилізотіазолон і 0.01 % Бромонітродіоксан. Готовий до використання.
- 3. Калібратор В (Cut -Off Стандарт)**  
2 мл людської сироватки, розведеної PBS, містить низькі концентрації антитіл IgA до Mycobacterial Tuberculosis. Доданий 0.01% Метилізотіазолон і 0.01 % Бромонітродіоксан. Готовий до використання.
- 4. Калібратор С (Слабкий позитивний контроль)**  
2 мл людської сироватки, розведеної PBS, містить середню концентрацію антитіл IgA до Mycobacterial Tuberculosis. Доданий 0.01% Метилізотіазолон і 0.01 % Бромонітродіоксан. Готовий до використання.
- 5. Калібратор D (позитивний контроль)**  
2 мл людської сироватки, розведеної PBS, містить високу концентрацію антитіл IgA до Mycobacterial Tuberculosis. Доданий 0.01% Метилізотіазолон і 0.01 % Бромонітродіоксан. Готовий до використання.
- 6. Ферментний Кон'югат**  
15 мл, анти-людський-IgA-HRP (кролик), в буферному розчині, який містить блок. Доданий 0.01% Метилізотіазолон і 0.01 % Бромонітродіоксан і 5 мг/л ProClin™. Готовий до використання.
- 7. Субстрат**  
15 мл, ТМВ (Тетраметилбензидин). Готовий до використання.
- 8. Стоп - розчин**  
15 мл, 0.5 М сірчаної кислоти. Готовий до використання.

9. **Розчин для розведення зразків**  
60 мл, PBS/BSA буфер. Доданий 0.095 % азид натрію. Готовий до використання.
10. **Промивний буфер**  
60 мл, PBS + Твін 20, 10х концентрат. Кінцева концентрація: розвести 1+9 дистильованою водою. Якщо при холодному зберіганні утворився осад, концентрат необхідно розігрівати при 37 °C протягом 15 хвилин.
11. **Пластикова плівка**  
2 штуки для покриття смужок під час інкубації.
12. **Пластиковий мішок**  
Багаторазового використання, для сухого зберігання невикористаних смуг.

#### Матеріали, необхідні, але не надані

- Мікро- і багатоканальні піпетки на 5 мкл, 100 мкл і 500 мкл
- Планшетний фотометр (450 нм)
- Планшетний вошер
- Пробірки для розведення сироватки
- Бідистильована вода

#### ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

В принципі, зразки сироватки або плазми (EDTA, гепарин) можуть бути використані для аналізу. Сироватка відділяється від крові, зібраної асептично з вени, після згортання і центрифугування. Зразки сироватки або плазми можна зберігати в холодильнику (2-8 °C) на протязі до 48 годин, для тривалого зберігання вони повинні зберігатися при -20 °C. Зразки не слід заморозувати та розморозувати багаторазово. Ліпемічні, гемолітичні або бактеріально забруднені зразки можуть давати помилково позитивні або помилково негативні результати.

Для проведення аналізу зразки (не стандарти) повинні бути розведені 1:101 з готовим до використання розчином для розведення зразків (наприклад, 5 мкл сироватки + 500 мкл розчинника зразка).

#### ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

##### 1. Підготовка реагентів

**Промивний Розчин:** розбавити перед використанням 1+9 дистильованою водою. Якщо при холодному зберіганні утворився осад, концентрат необхідно розігрівати при 37 °C протягом 15 хвилин.

- Суворе дотримання протоколу рекомендується для надійної роботи. Відповідальність за будь-які зміни або модифікації несе користувач.
- Всі реагенти повинні бути доведені до кімнатної температури перед використанням, але не повинні бути залишені при цій температурі довше, ніж необхідно.
- Стандарти та зразки слід аналізувати у двох примірниках.
- Стандартна крива повинна бути побудована при кожному аналізі.
- Повернути невикористані смужки в пластиковий пакет і зберігати їх сухими при температурі 2-8 °C.

##### 2. Процедурні кроки

1. Підготувати достатню кількість лунок для стандартів, контролей і зразків у двох примірниках, а також для бланка субстрату.
2. Піпетувати 100 мкл кожного з **розбавлених** (1:101) зразків і **готових до використання** стандартів і контролей відповідно в лунки. Залишити одну порожню лунку для бланка субстрату.
3. Накрити планшет фольгою і інкубувати при кімнатній температурі протягом 60 хвилин.
4. Видалити вміст лунок (вимити або аспірувати) і додати 300 мкл розведеного розчину для промивання. Цю процедуру повторити три рази в загальній кількості. Залишки промивного буферу видалити обережним постукуванням планшета на тканину.
5. Піпетувати 100 мкл кожного з готових до використання кон'югатів в лунки. Залишити одну порожню лунку для бланка субстрату.
6. Накрити планшет фольгою і інкубувати при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.
7. Видалити вміст лунок (вимити або аспірувати) і додати 300 мкл розведеного розчину для промивання. Цю процедуру повторити три рази в загальній кількості. Залишки промивного буферу видалити обережним постукуванням планшета на тканину.
8. Піпетувати 100 мкл кожного з готових до використання субстратів в лунки. Цього разу також піпетується бланк субстрату.
9. Накрити планшет фольгою і інкубувати при кімнатній температурі протягом 20 хвилин у темряві (наприклад, в тумбочці).
10. Для зупинки реакції субстрату, піпетувати 100 мкл кожного з готових до використання стоп-розчину в лунки. Внесіть також бланк субстрат.

11. Після ретельного перемішування та очищення нижньої частини пластини, зчитати результати поглинання при 450 нм. (За вибором референтна довжина хвилі 620 нм). Забарвлення стабільне протягом принаймні 60 хвилин.

#### ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

Середні значення для виміряного поглинання розраховуються після вирахування значення Бланк субстрату. Різниця між значеннями не повинна перевищувати 10%.

#### Приклад

	OD Value	corrected OD	Mean OD Value
Substrate Blank	0.013		
Negative Control	0.022 / 0.023	0.009 / 0.010	0.010
Cut-Off Standard	0.599 / 0.613	0.586 / 0.600	0.593
Weak Positive Control	1.099 / 1.046	1.086 / 1.033	1.060
Positive Control	2.021 / 1.893	2.008 / 1.880	1.944

Наведена вище таблиця містить лише приклад, який був отриманий при довільних температурах і умовах навколишнього середовища. Описані наведені дані **не є контрольними значеннями**, які повинні бути визначені в інших лабораторіях таким же чином.

##### 1. Якісна оцінка

Розраховані поглинання для сироваток пацієнтів, як згадувалося вище, порівнюються з Cut-off значенням стандарту. Якщо значення зразка вище, то це позитивний результат.

При значенні нижче Cut-off значення стандарту маємо негативний результат. Доцільним є визначення діапазону  $\pm 20\%$  навколо Cut-off значення в сирій зоні. У такому разі рекомендується проведення повторного аналізу з тієї ж сироваткою або з новим зразком одного і того ж пацієнта, взятого через 2-4 тижні. Обидва зразки повинні аналізуватися паралельно в одному аналізі.

Позитивний контроль повинен показати, принаймні, подвійне значення поглинання в порівнянні зі значенням Cut-off стандарту.

##### 2. Кількісна оцінка

Готові до використання стандарти і контролі визначені і виражені у відносних одиницях (Од/мл). Це призводить до точної і відтворюваної кількісної оцінки. Отже, для даного пацієнта проведення наступного контролю стало можливим. Значення для контролів і стандартів у одиницях надруковані на етикетках флаконів. Для кількісної оцінки значення поглинань Стандартів та контролей графічно відкладені проти їх концентрацій. З отриманої калібрувальної кривої можуть бути отримані значення концентрацій для кожного зразка пацієнта по відношенню до їх поглинання. Крім того, можна використовувати автоматичні комп'ютерні програми.

##### 3. Інтерпретація

Хоча антитіла можуть виявляти у здорових людей в рідкісних випадках, як правило, вони вказують на колонізацію мікобактерій туберкульозу. Позитивні результати IgM вказують на ранню стадію інфекції. У ході інфекції має місце сероконверсія антитіл до IgG. Одночасна присутність IgG і IgM Антитіл вказує на інфекцію на ранній стадії або реактивацію хронічної інфекції. Виявлення тільки IgG вказує на завершену імунологічну реакцію. IgA антитіла з'являються після початкової активації імунної реакції, на що вказує наявність IgM, та пов'язані з високим запальним потенціалом. Так як на них не впливають енергетичні ефекти, такі як антитіла IgG, вони є корисними маркерами у пацієнтів, які показують знижену реакцію IgG за рахунок попередньо існуючої імунної депресії. Гуморальна реакція може бути підсумована таким чином:

- IgM (-) IgG (-) IgA (-) - ніякої інфекції
- IgM (+) IgG (-) IgA (-) - інфекція на самій ранній стадії
- IgM (-) IgG (+) IgA (+/-) - завершена інфекція
- IgM (+) IgG (+) IgA (+/-) - інфекція на ранній стадії чи повторне зараження
- IgM (-) IgG (-) IgA (+) - завершена інфекція у пацієнтів, які страждають від знижених IgG.

## РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Mycobacterium ELISA	IgG	IgA	IgM
Intra-Assay-Precision	7.6 %	7.9 %	7.9 %
Inter-Assay-Precision	9.4 %	7.4 %	7.4 %
Inter-Lot-Precision	3.1 – 9.9 %	5.7 – 8.9 %	5.7 – 8.9 %
Analytical Sensitivity	1.09 U/mL	1.34 U/ml	1.22 U/mL
Recovery	86 – 95 %	87 – 96 %	87 – 91 %
Linearity	82 – 113 %	78 – 111 %	78 – 118 %
Cross-Reactivity	No cross-reactivity to <i>Helicobacter pylori</i> and <i>Bordetella pertussis</i> .		
Interferences	No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL		
Clinical Specificity	99 %	99 %	100 %
Clinical Sensitivity	100 %	100 %	100 %



### 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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)