

# НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО МАЛЯРІЙНОГО ПЛАЗМОДІЯ

## Malaria Ab

Кат. № : **MALAB.CE**

Дата випуску інструкції: **2019/10**  
Версія: **11**



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

**Імуноферментний аналіз 3<sup>го</sup> покоління для визначення антитіл до плазмодіїв у сироватці та плазмі людини**

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

### А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Ферментний імуноаналіз (ІФА) для визначення антитіл до плазмодіїв у плазмі та сироватці людини. Набір призначений для скринінгу одиниць крові та ідентифікації людей, які контактували з найпростішими та розвивали імунну відповідь.

Набір призначений лише для діагностики in vitro, і тест повинні проводити професійні люди, які мають відповідну підготовку.

### В. ВСТУП

Плазмодії — це облигатні внутрішньоклітинні найпростіші, споріднені з Бабезією та Токсоплазмою. Плазмодії розмножуються статевим шляхом у комарів; комарі передають спорозоїти, що утворюються, людям, де організми розмножуються безстатевим шляхом. Спорозоїти розмножуються в печінці; отримані мерозоїти вторгаються в еритроцити, де мерозоїти розмножуються або дозрівають у чоловічі та жіночі гаметоцити, які в кінцевому підсумку будуть захоплені комаром під час їжі.

*P.falciparum* і *P.vivax* спричиняють приблизно 80% і 15%, відповідно, усіх випадків малярії. Малярія є найважчим інфекційним захворюванням тропічних і субтропічних районів світу, яке досі сильно вражає мільйони людей і спричиняє мільйони жертв.

Виявлення антитіл до плазмодіїв може ідентифікувати у підозрюваних осіб випадок недавньої або минулої малярії.

### С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Рекомбінантні білки, що представляють імунодомінантні епітопи плазмодію, наносяться на лунки мікропланшету.

Рекомбінантні білки були ретельно відібрані для забезпечення скринінгу всіх антитіл до плазмодіїв. У ці лунки додають зразки сироватки або плазми, і якщо в зразку присутні антитіла, специфічні до плазмодіїв (IgG, IgM або IgA), вони утворюють стабільні комплекси з рекомбінантними антигенами в лунці.

Потім комплекси антиген-антитіло ідентифікують шляхом послідовного додавання: (1) тих самих біотинільованих рекомбінантних білків, специфічних для Р.видів і; (2) кон'югат пероксидази хрому HRP Стрептавідин.

Гідролітична активність пероксидази хрому дозволяє кількісно визначити ці комплекси антитіло-антиген.

Потім додають розчин субстрату пероксидази.

Під час інкубації синій колір розвиватиметься пропорційно кількості антитіл до плазмодіїв, зв'язаних із лункою, таким чином встановлюючи їх наявність чи відсутність у зразку. Лунки, що містять зразки, негативні на анти-плазмодії антитіл залишаються безбарвними.

У кожну лунку додають стоп-розчин і отриманий жовтий колір зчитують на зчитувачі для мікропланшетів при 450 нм (nm).

### Д. КОМПОНЕНТИ

Код MALAB.CE містить достатньо реагентів для проведення 96/192/480/960 тестів. Нижче описано склад стандартного формату (192 тести/набір).

#### Мікропланшет MICROPLATE

2 мікропланшети. 12 смужок по 8 мікролунок, покритих рекомбінантними антигенами, специфічними для плазмодію. Планшети запаковані в пакет з осушувачем.

#### Негативний контроль CONTROL -

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання контроль. Поліпропіленовий флакон з пластиковою кришкою білого кольору, що закручується. Містить сироватку людини, негативну на антитіла Р. видів, і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Негативний контроль має блідо-жовтий колір. Реагент блідо-жовтого кольору.

#### Позитивний контроль CONTROL +

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання контроль. Поліпропіленовий флакон із пластиковою синьою кришкою, що закручується. Містить сироватку людини, позитивну на антитіла виду Р., і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Позитивний контроль світло-зеленого кольору.

**Важлива примітка:** навіть якщо цей компонент був оброблений хімічними речовинами, здатними інактивувати види Р., це не повністю гарантує відсутність життєздатних патогенів, і тому контроль слід розглядати як потенційно біологічно небезпечний відповідно до належної лабораторної практики.

#### Калібратор: CAL...

2 флакони. Флакон із боросилікатного скла з кришкою під кришкою та пластиковою чашкою, що закручується, жовтого кольору. Ретельно розчиніть вміст ліофілізованого флакону з об'ємом води класу ЕІА, зазначеним на етикетці. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

#### Важливі примітки:

- 1) Після розведення Калібратор не є стабільним. Зберігати в алікватах при -20°C (°C).
- 2) Навіть якщо цей компонент був оброблений хімічними речовинами, здатними інактивувати Р.види, це не повністю гарантує відсутність життєздатних патогенів, а отже, контроль слід розглядати як потенційно біологічно небезпечний відповідно до належної лабораторної практики.

#### Концентрат буферу для промивання: WASHBUF 20X

2x60 мл/пляшка (ml/bottle). 20-кратний концентрований розчин. Поліпропіленова пляшка з пластиковою кришкою, що закручується, білого кольору. Містить 0.045% ProClin 300. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатний буферний фізіологічний розчин рН 7.0+/-0.2 і 0.05% Твін 20.

#### Кон'югат №1: CONJ 1

8 флаконів. Флакон із боросилікатного скла з кришкою під кришкою та пластиковою кришкою, що закручується, білого кольору. Флакон містить ліофілізовані біотинільовані рекомбінантні антигени Р. видів. Флакони необхідно повністю розчинити в 6 мл кон'югату № 2.

#### Кон'югат №2: CONJ 2

1x60 мл/пляшка (ml/bottle). Поліпропіленова пляшка з пластиковою кришкою, що закручується, червоного кольору. Розчин містить HRP, кон'югований зі стрептавідином, у фізіологічному буфері Трис, з добавками 0.045% ProClin 300, Твін 20 та BSA. Цей компонент має червоний колір.

#### Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x50 мл/флакон (ml/vial). Поліпропіленовий флакон бурштинового кольору з пластиковою чорною кришкою, що закручується. Готовий до використання компонент. Містить 50 мМ (mM) цитратний буфер рН 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксид, 0.03% тетраметилбензидин або ТМБ і 0.02% перекис водню або H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

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

#### Сірчана кислота: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x32 мл/пляшка (ml/vial). Поліпропіленовий флакон з пластиковою білою кришечкою. Містить 0.3 M розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)

#### Розчинник для зразка: DILSPE

1x25 мл/флакон (ml/vial). Поліпропіленовий флакон з пластиковою кришечкою, зеленого кольору. Містить буфер Трис, доповнений 0.045% ProClin 300 і Твін 20; використовується для розведення зразка. Цей компонент має зелений колір.

#### Ущільнювальна фольга для планшету 4 шт.

#### Вкладиш інструкції 1 шт.

За запитом:

#### Калібрувальна крива: CAL N°....

5x2.0 мл/флакон (ml/vial). Готова до використання та кольорова стандартна крива в діапазоні: 0-0.5-1-2.5-5 ВООЗ мМО/мл (mIU/ml). (CAL1=0 мМО/мл (mIU/ml), CAL2=0.5 мМО/мл (mIU/ml), CAL3=1 мМО/мл (mIU/ml), CAL4=2.5 мМО/мл (mIU/ml), CAL5=5 мМО/мл (mIU/ml)).

Містить білки сироватки, 0.3 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Стандарти забарвлюються зі зменшенням інтенсивності харчового синього барвника.

**Важлива примітка:** Тільки за спеціальним запитом Dia.Pro може надати реагенти для 96, 480, 960 тестів, як зазначено нижче:

Мікропланшет	1	5	10
Негативний контроль	1 x 2.0 мл/флакон	1 x 10 мл/флакон	1 x 20 мл/флакон
Позитивний контроль	1 x 2.0 мл/флакон	1 x 10 мл/флакон	1 x 20 мл/флакон
Калібратор	1 флакон	5 флаконів	10 флаконів
Концентрат буферу для промивання 20X	1 x 60 мл/флакон	5 x 60 мл/флакон	4x150мл/пляшку
Кон'югат №1	5 флаконів	20 флаконів	40 флаконів
Кон'югат №2	1 x 36 мл/флакон	3 x 50 мл/флакон	6x50 мл/флакон
Хром./Субстрат	1 x 25 мл/флакон	3 x 42 мл/флакон	2x125мл/флакон
Сірчана кислота	1 x 15 мл/флакон	2 x 40 мл/флакон	2 x 80 мл/флакон
Розчинник для зразка	1 x 15 мл/флакон	1 x 65 мл/флакон	1x140мл/флакон
Герметична плівка	2	10	20
Інструкція	1	1	1
<b>К-ст тестів</b>	<b>96</b>	<b>480</b>	<b>960</b>
<b>Код</b>	<b>MALAB.CE.96</b>	<b>MALAB.CE.480</b>	<b>MALAB.CE.960</b>

#### Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

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

#### Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
- 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.
- 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 біомедицинічних лабораторіях», вид. 1984 рік.
- Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
- 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 Хромген/Субстрат дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
- Після отримання, зберігайте набір при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
- Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
- Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо заміни набору.
- Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
- Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між

використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.

- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах).
- Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедицинічних лабораторіях», вид. 1984 рік.
- Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Відходи, що утворились 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).
- 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.
- Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
- 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

- 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.
- Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків; особливо азиду натрію, оскільки ця хімічна речовина впливатиме на ферментативну активність кон'югату, даючи помилково негативні результати.
- 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.
- 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.
- 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 вибрані 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.
- Якщо присутні частинки, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8µ для очищення зразка перед тестуванням.
- Не використовуйте інактивовані теплом зразки, оскільки вони можуть давати помилкову реактивність.

#### Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на будь-яку відповідну втрату активності до 2 місяців.

#### Мікропланшети:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури (приблизно 1 год). Переконайтеся, що мішечок не пошкоджений або чи є якийсь дефект, що вказує на проблему зберігання. У цьому випадку зателефонуйте до служби 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). Після першого відкриття невикористані смужки стабільні протягом 2 місяців.

#### Негативний контроль:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

#### Позитивний контроль:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі. Поводитися з цим компонентом як з потенційно інфекційним, навіть якщо цей агент, якщо він присутній у контролі, був хімічно інактивованим.

#### Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням 20X концентрований розчин слід розбавити подвійно дистильованою водою до 1200 мл (мл) і обережно перемішати обертанням з денця на кришку.

Якщо 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 миття.

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

#### Кон'югат №1 та кон'югат №2 розчин суміші:

Розчин суміші кон'югату №1 і кон'югату №2 необхідно готувати безпосередньо перед дозуванням розчинника для зразка. Додайте 6 мл (мл) кон'югату №2 безпосередньо в один флакон кон'югату №1 і обережно перемішайте, перевертаючи, щоб розчинити ліофілізований порошок. Цього препарату достатньо для 24 тестів або 3 повних смужок.

**Важлива примітка:** будь-яку невикористану частину цього відновленого розчину кон'югату №1 можна зберігати при 2...8°C (°C) не більше 12 годин.

#### Кон'югат №2:

Готовий до використання реагент. Перед використанням добре перемішати на вортексі.

#### 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.

#### Сірчана кислота:

Готовий 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 серйозне подразнення очей.

Попереджувальні **P-фрази:**

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

**P302+P352** - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКИРУ: 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:

Готови до використання. Змішайте на вортексі перед використанням.

#### Калібратор:

Ретельно розчиніть вміст ліофілізованого флакону з об'ємом води класу EIA, зазначеним на етикетці. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

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

- 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. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 2%. Дезактивацію розливів або залишків компонентів набору також слід проводити регулярно.
- 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.
- 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 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.
- Час інкубації має допуск ± 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.
- 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.
- При використанні автоматичних пристроїв, якщо тримач для флаконів інструменту не підходить до флаконів, що входять до набору, перелійте розчин у відповідні контейнери та промаркуйте їх такою ж етикеткою, яка була відірвана від оригінального флакону. Ця операція важлива для уникнення невідповідності вмісту флаконів під час їх перенесення. Після закінчення тестування, поверніть вторинні марковані контейнери до температури 2..8°C, щільно закрийте, якщо вони не забруднені під час використання (у випадку інструменту з фіксованою голкою, без одноразових наконечників).
- 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. Переконайтесь, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтесь, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою. Переконайтесь, що при транспортуванні не сталося поломки і не пролито рідини всередині коробки. Переконайтесь, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
3. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
4. Розчиніть кон'югат №1 як описано у відповідному пункті.
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, праїмуючи розведеним промивним розчином, згідно з інструкціями виробника. Установіть потрібну кількість циклів промивання, як зазначено в спеціальному розділі.
7. Переконайтесь, що ІФА зчитувач увімкнено або переконайтесь, що він увімкнений принаймні за 20 хвилин до зчитування.
8. Якщо використовується автоматизована робоча станція, увімкніть, перевірте налаштування та переконайтесь, що ви використовуєте правильний протокол аналізу.
9. Переконайтесь, 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.

### Проведення аналізу вручну:

1. Ресуспендуйте вміст правильної кількості флаконів кон'югату № 1 з 6 мл (ml) кон'югату № 2 перед початком роздачі зразків і контролів. *Одного флакону такого змішаного кон'югату в основному вистачає на 3 смужки. Рекомендується розчиняти тільки ті флакони, які строго необхідні для запуску.*
2. Розмістіть необхідну кількість лунок у тримачі. Залишіть першу лунку порожньою для бланкування.
3. Додайте 50 мкл (µl) Розчинника для зразків у всі лунки, окрім А1, що використовується для бланкування.
4. Потім піпеткою внесіть 100 мкл (µl) Негативного контролю в трьох примірниках, 150 мкл (µl) Позитивного контролю одноразово, і потім 150 мкл (µl) Калібратора у двох примірниках у відповідні лунки.
5. Додайте 150 мкл (µl) Зразків у кожну правильно ідентифіковану лунку та аспіруйте/дайте той самий об'єм щонайменше 2 рази за допомогою тієї ж піпетки/наконечника, щоб повністю розчинити зразок у розчиннику.
6. Інкубуйте мікропланшет при **+37 °C (°C) протягом 60 хв.**

### Важлива примітка:

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

7. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, доставивши та аспірувавши 350 мкл/лунку (µl/well) розведеного промивного розчину, як повідомлялося раніше (розділ 1.3).
8. Внесіть піпеткою 200 мкл (µl) суміші кон'югату № 1 і кон'югату № 2, пригтовлених, як описано раніше, у кожну лунку, крім 1-ї бланк-лунки, і накрийте герметиком.

**Важливо:** *Будьте обережні, щоб не торкнутися внутрішньої поверхні лунки кінчиком піпетки під час видачі Кон'югату. Може відбутися забруднення.*

9. Інкубувати мікропланшет герметично закритим **протягом 60 хв при +37°C (°C).**
10. Промити як описано у пункті 7.

11. Внесіть 200 мкл (µl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включаючи бланк-лунки. Потім інкубуйте мікропланшет **при кімнатній температурі (18-25°C (°C)) протягом 30 хвилин.** Розпочніть вимірювання відразу після додавання цього компонента у першу лунку.

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

12. Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти в кожну лунку, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 13. Додавання кислоти перетворить позитивні контролі та позитивні зразки з синього кольору на жовтий.
13. Виміряйте інтенсивність кольору розчину в кожній лунці, як описано в розділі 1.5, на фільтрі 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (віднімання фону), гасячи інструмент на А1 (обов'язково).

### Важливі зауваження:

1. *Переконайтесь, 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 30 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.*

### Автоматизований метод проведення аналізу:

1. Перед початком аналізу ресуспендуйте вміст правильної кількості флаконів кон'югату № 1 з 6 мл (ml) кон'югату № 2. Після того, як ліофілізовані порошки розчиняться та будуть добре перемішані, їх потрібно змішати разом у пластиковому контейнері, і можна почати аналіз.  
**Примітка:** *одного флакону з такими змішаними кон'югатами в основному достатньо для 3 смужок. Рекомендується розчиняти тільки ті флакони, які строго необхідні для запуску.*
2. У випадку, якщо тест виконується автоматично за допомогою системи ІФА, ми пропонуємо змусити прилад спочатку дозувати 50 мкл (µl) розчинника зразка, а потім 150 мкл (µl) контролю та зразків, струшуючи мікропланшет для гомогенізації розведення. Перед аспіруванням наступного зразка голки (якщо закріплені) необхідно належним чином промити, щоб уникнути перехресного забруднення зразків, або необхідно змінити одноразові наконечники.
3. Для наступних операцій дотримуйтесь інструкцій з експлуатації, наведених раніше для ручного аналізу.
4. Настійно рекомендується переконатися, що проміжок часу між подачею першої та останньої проби буде розраховано приладом і враховано, відповідно відкладаючи першу операцію промивання.

**Примітка:** *Коли зразок додається, колір лунки змінюється із зеленого на синій. Зміна кольору помітна неозброєним оком, і її інтенсивність можна прочитати згідно з процедурою перевірки дозування (розділ N).*

## N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Розчинник для зразків	50 мкл (µl)
Контролі	150 мкл (µl)
Калібратор (*)	150 мкл (µl)
Зразки	150 мкл (µl)
<b>1-а інкубація</b>	<b>60 хв</b>
Температура	+37 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Кон'югат 1 та 2 Суміш	200 мкл (µl)
<b>2-а інкубація</b>	<b>60 хв</b>
Температура	+37 °C (°C)
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>	200 мкл (µl)
<b>3-я інкубація</b>	<b>30 хв</b>
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (µl)
Зчитування ОЦ	450 нм (nm) /620-630 нм (nm)

### Процедура перевірки видачі:

Додавання Розчину для зразків, Зразків, розчину суміші Кон'югату № 1+2, Хромогену/Субстрату, перевіряється шляхом зчитування лунок при 405 нм (nm) відповідно до того, що визначено в наступній таблиці:

Етапи (додавання)	Обсяг, який необхідно внести	Перевірка (зчитування)
Порожня лунка	////	ОЩ405 нм (nm) < 0.050
Розчинник для зразка	50 мкл (μl)	ОЩ405 нм (nm) ≥ 0.130
Після додавання зразка	150 мкл (μl)	ОЩ405 нм (nm) ≥ 0.350
Суміш кон'югатів 1+2	200 мкл (μl)	ОЩ405 нм (nm) ≥ 0.150
Хромоген/Субстрат	200 мкл (μl)	ОЩ405 нм (nm) ≥ 0.090

### (\* Важливі примітки:

- Калібратор (CAL) не впливає на розрахунок Cut-off, тому його використання не є обов'язковим, але все одно рекомендовано для внутрішньої процедури контролю якості.

Нижче у таблиці наведено приклад схеми видачі (проведення аналізу вручну):

#### Мікропланшет

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL (*)	S6										
F	CAL (*)	S7										
G	POS	S8										
H	S1	S9										

Легенда: BLK = Бланк NC = Негативний Контроль POS = Позитивний контроль S = Зразок CAL (\*) = Калібратор – необов'язковий

### О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Контроль і калібратор перевіряються щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи відповідають їхні значення ОЩ450 нм (nm) очікуваним і зазначеним у таблиці нижче.

Перевірка	Вимоги
Бланк-лунка	≤ 0.100 Значення ОЩ 450 нм (nm)
Негативний контроль (NC)	≤ 0.200 ОЩ 450 нм (nm) після бланкування Поглинання окремих значень негативного контролю має бути менше або дорівнювати 0.200. Якщо одне значення виходить за межі цього діапазону, відкиньте це значення та перерахуйте середнє. Якщо два значення виходять за межі цього діапазону, цикл слід повторити.
Позитивний контроль	Середнє значення ОЩ 450 нм (nm) ≥ 0.500

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

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі, оскільки дані недійсні.

Проблема	Перевірка
Бланк-лунка > 0.100 ОЩ450 нм (nm)	1. щоб розчин Хромогену/Субстрату не був забруднений під час аналізу
Негативний контроль (NC) > 0.200 ОЩ450 нм (nm) після бланкування	1. щоб процедури промивання та налаштування вошера були підтвержені 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 контролю); 4. що жодного забруднення негативного контролю або лунок, куди був доданий контроль, не відбулося

	через позитивні зразки, розлив або ферментний кон'югат; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом 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 негативний контроль замість позитивного. У такому разі, негативний контроль становитиме ОЩ450 нм (nm) > 0.150, також); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення позитивного контролю.

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

### Важлива примітка:

Якщо використовується Калібратор, перевірте наступні дані:

Перевірка	Вимоги
Калібратор	S/Co > 1.0

Якщо результати тесту не відповідають наведеним вище вимогам, то слід діяти наступним чином:

Проблема	Перевірка
Калібратор S/Co < 1	1. що процедура проведена правильно; 2. що під час дистрибуції не допущено жодної помилки (напр. додали негативний контроль); 3. що процедура миття та налаштування вошера перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.

У будь-якому випадку, якщо всі інші параметри (Бланк, Негативний контроль, Позитивний контроль) відповідають встановленим вимогам, тест можна вважати дійсним.

### P. РОЗРАХУНОК CUT-OFF

Результати випробувань обчислюють за допомогою граничного значення cut-off, визначеного за такою формулою для середнього значення ОЩ450 нм (nm) негативного контролю (NC):

$$NC + 0.300 = \text{Cut-off (Co)}$$

Значення, знайдене для тесту, використовується для інтерпретації результатів, як описано в наступному параграфі.

**Важливе зауваження:** Коли обчислення результатів здійснюється за допомогою оперативної системи автоматизованої робочої станції IFA, переконайтеся, що для обчислення граничної величини cut-off та отримання правильних інтерпретацій результатів використовується правильна формула.

### Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення ОЩ450 нм (nm) зразка та значення cut-off (або S/Co), відповідно до наступної таблиці:

S/Co	Інтерпретація
< 0.9	Негативний
0.9 – 1.1	Середній
> 1.1	Позитивний

Зразки зі значенням S/Co < 0.9 вважаються негативними, і цей результат свідчить про те, що пацієнт не був заражений видами Плазмодія.

Зразки зі значенням S/Co > 1.1 вважаються позитивними, і цей результат вказує на недавнє або минуле зараження видами Плазмодія.

Зразки, що показують значення S/Co в сірій зоні 0.9 – 1.1, необхідно повторно перевірити через 2-3 тижні, щоб перевірити, чи є результат позитивним.

#### Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
2. Відповідно до директиви NIH США, будь-який позитивний результат скринінгу крові повинен бути підтверджений методом підтвердження, здатним виявити антитіла до антигенів малярії до того, як буде сформульований діагноз інфекції.
3. Тести на нуклеїнову кислоту (NAT) на малярію *ssp* не призначені для підтвердження аналізу на антитіла за визначенням. Однак вони можуть бути використані відповідальними лабораторіями, щоб вирішити, чи можна переливати одиницю крові, навіть за наявності антитіл (запитайте DiaPro srl щодо набору Malaria *ssp* RealTime PCR).
4. Як було доведено в Оцінці ефективності продукту, аналіз здатний виявити антитіла проти малярії *ssp* **раніше**, ніж деякі інші комерційні набори. Тому позитивний результат, не підтверджений цими менш чутливими комерційними наборами, не може вважатися хибнопозитивним результатом, якщо немає інших доказів. Зразок слід надати на Аналіз-Підтвердження.
5. Коли результати випробувань передаються з лабораторії в іншу установу, необхідно звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
6. Діагностику малярійної інфекції має проводити і передавати пацієнту тільки кваліфікований лікар. Наявність антитіл у будь-якому випадку не означає, що у пацієнта на момент аналізу є інфекція. Антитіла можуть зберігатися протягом життя пацієнта навіть за відсутності в крові живих мікроорганізмів Malaria *ssp*. Діагноз інфекції Malaria *ssp* повинен бути встановлений лише за наявності інших клінічних та діагностичних ознак (наявність антигену малярії в крові за допомогою ПЛР у реальному часі або іншими методами).

Приклад обчислення показаний нижче:

Наведені нижче дані не можна використовувати замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Негативний контроль: 0.048 – 0.050 – 0.052 ОЩ450 нм (nm)  
 Середнє значення: 0.050 ОЩ450 нм (nm)  
 Нижче, ніж 0.200 – Прийнято  
 Cut-off = 0.050 + 0.300 = 0.350  
 Позитивний контроль: 1.000 ОЩ450 нм (nm) середнє значення  
 Вище, ніж 0.500 – Прийнято  
 Калібратор: 0.810 ОЩ450 нм (nm) середнє значення  
 S/Co > 1 – Прийнято  
 Зразок 1: 0.070 ОЩ450 нм (nm)  
 Зразок 2: 1.690 ОЩ450 нм (nm)  
 Зразок 1 S/Co < 1 = негативний  
 Зразок 2 S/Co > 1 = позитивний

## R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 1. ЧУТЛИВІСТЬ:

Аналітична чутливість аналізу була визначена за допомогою першого референсного реагенту ВООЗ для сироватки людини проти малярії (Plasmodium Falciparum), код NIBSC: 10/198.

Результати обмеженого розведення референсного стандарту в негативний зразок (Neg Control) наведені в таблиці нижче, де вказано середні значення, отримані в результаті аналізу трьох різних партій приладу.

ВООЗ МО/мл (IU/ml)	ОЩ450 нм (nm)	Co/S
10	3.767	10.3
5	2.485	6.8
2.5	1.310	3.6
1	0.547	1.5
0.5	0.276	0.8
0.25	0.161	0.4
Нег. контроль	0.060	0.2

Чутливість, показана аналізом, краща за 1 МО/мл ВООЗ (WHO IU/ml).

Крім того, чутливість системи була оцінена на панелі, наданій NIBSC, Великобританія, для антитіл до видів Плазмодія. Результати трьох лотів продукту, виражені як значення S/Co, підсумовані в таблиці нижче:

ID члена	Види Плазмодію	S/Co
71/281 Версія 3.0 від 14.04.2008	p. Vivax	>5.0
72/348 Версія 3.0 від 14.04.2008	p. Vivax	>2.0
72/092 Версія 3.0 від 14.04.2008	p. Falciparum	>1.1
71/326 Версія 3.0 від 14.04.2008	p. Vivax	>5.0
72/096 Версія 3.0 від 14.04.2008	p. Malariae	>5.0
72/345 Версія 3.0 від 14.04.2008	p. Falciparum	>5.0
72/341 Версія 3.0 від 14.04.2008	p. Falciparum	>5.0

Крім того, чутливість продукту Malaria Ab була оцінена на панелі EFS Ac anti-PALUDEEN, партія № 07.191026 (DQ030), наданої Etablissement Francais Du Sang (EFS), Франція, з такими результатами:

Зразок	ID	S/Co
Ac PALU №1	6914478877	>2.5
Ac PALU №2	69081724789	>2.0
Ac PALU №3	4406095555	>4.0
Ac PALU №4	Розчинник	<0.9

Нарешті, чутливість була перевірена під час тестування **контрольного зразка CRS PAL партії 2701163** (Contrôle interne monoparamétrique Ac anti-plasmodium), наданого Etablissement Francais Du Sang (EFS) з трьома партіями пристрою. Контроль завжди був позитивним, отримуючи значення індексу вище 1.2 (S/Co > 1.2).

Діагностична чутливість аналізу була розрахована на панелі зразків, позитивних на антитіла до видів Плазмодія, які раніше класифікувалися як позитивні за референсним методом. Тест показує чутливість > 95% до плазми та сироватки.

### 2. ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ:

Була розрахована на панелях негативних донорів крові, попередньо визначених негативними референсним методом (Diamed/Biorad). Аналіз показує специфічність > 98% у плазмі та сироватці.

### 3. ВІДТВОРЮВАНІСТЬ:

Нижче наведено середні значення, отримані в результаті дослідження, проведеного на двох зразках з різною анти-HAV реактивністю, досліджених у 16 повтореннях у трьох окремих запусках:

#### Негативний зразок (к-сть = 16)

Середні значення	1 запуск	2 запуск	3 запуск	Середнє значення
ОЩ450 нм (nm)	0.136	0.146	0.153	0.145
СВ	0.009	0.014	0.011	0.011
КВ%	6.4	9.3	7.5	7.7

#### Калібратор (к-сть = 16)

Середні значення	1 запуск	2 запуск	3 запуск	Середнє значення
ОЩ450 нм (nm)	0.889	0.860	0.844	0.864
СВ	0.051	0.048	0.094	0.064
КВ%	4.3	3.8	7.0	5.0

#### Позитивний зразок (к-сть = 16)

Середні значення	1 запуск	2 запуск	3 запуск	Середнє значення
ОЩ450 нм (nm)	3.191	3.300	3.175	3.222
СВ	0.062	0.098	0.103	0.088
КВ%	1.9	3.0	3.2	2.7

З наведених вище даних було отримано наступні статистичні значення:

Середні значення К-сть = 48	Негативний зразок	Калібратор	Позитивний зразок
ОЩ450 нм (nm)	0.145	0.864	3.222
СВ	0.011	0.064	0.088
КВ%	7.7	5.0	2.7

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Garcia LS et al. Update on Malaria. Clin Microbiol News Lett; 1992, 14:65-9
2. Krogstad DJ et al. Plasmodium species (Malaria) principles and practice of infectious diseases, 4th ed, MandellGL et al., 1995, 2415-27.
3. Smith JH et al. Malaria: clinical laboratory features. Clin Microbiol News Lett, 1995,17(24): 185-8.

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](mailto:info@diapro.it)

##### **ТОВ ДІА.ПРО**

*Діагностік Біопробс s.r.l.*  
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](mailto: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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

