



Набор для определения антител к *Mycoplasma IgG*

Кат. номер : 8042
Количество : 96
Производитель : DAI (USA)

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

Версия 01/20/06

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Набор – двух ступенчатый инкубационный антиген «сэндвич» иммуоферментный метод, в котором используются полистироловые микропланшетные стрипы, покрытые

Энзимно-связанный иммуно-ферментный анализ (ELISA) базируется на способности биологических материалов (напр., антигенов) абсорбироваться к пластической поверхности как полистирол (твердая фаза). Когда антигены, привязанные к твердой фазе, вступают в контакт с сывороткой пациента, антиген специфическое антитело, если оно присутствует, связывается с антигеном, на твердой фазе, формируя комплекс антиген-антитело. Оставшиеся антитела удаляются промыванием. Потом следует добавление козлиного анти-человеческого IgG конъюгированного пероксидазой хрена, что связывается с комплексом антитело-антиген. Остаток конъюгата удаляется промыванием, потом добавляется хромоген / субстрат ТМВ. Если антитело специфическое к антигену присутствует в сыворотке пациента, развивается желтый окрас. Окрас, пропорциональный концентрации антитела в сыворотке, может считываться подходящим спектрофотометром или микропланшетным ридером.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ.

Каждый набор содержит точное количество компонентов, необходимое для числа анализов, указанное на этикетке.

1. **Антиген микоплазмы** (инактивированный) привитый к микропланшету: 96 ячеек, разделен на 12 1x8 стрипов, что храниться в фольговом пакете с осушителем / индикатором влаги. – **96Т: 1 планшет.**
2. **Разбавитель сыворотки:** готовый к использованию. Содержит проклин (0,1%) в качестве консерванта – **96Т: 1 бут. 30 мл.**
3. **Калибратор величины исключения** человеческая сыворотка дефибринированная плазма. Азид натрия (<0,1%) и pen/strep (0,01%) добавлены в качестве консерванта, со специфическим фактором набора, указанном на наборе.– **96Т: 1 фл., 0,4 мл.**
4. **Высоко Положительный контроль:** человеческая сыворотка или дефибринированная плазма. Азид натрия (<0,1%) и pen/strep (0,01%) добавлены в качестве консерванта, с установленным диапазоном, указанном на наборе. – **96Т: 1 фл., 0,4 мл.**

5. **Низко Положительный контроль:** человеческая сыворотка или дефибринированная плазма. Азид натрия (0,1%) и pen/strep (0,01%) добавлены в качестве консерванта, с установленным диапазоном, указанном на наборе.– **96Т: 1 фл., 0,4 мл.**
6. **Отрицательный контроль:** человеческая сыворотка или дефибринированная плазма. Азид натрия (0,1%) и pen/strep (0,01%) добавлены в качестве консерванта, с установленным диапазоном, указанным на этикетке – **96Т: 1 фл., 0,4 мл.**
*Примечание: флакон сыворотки может содержать лишний объем.
7. **Конъюгат пероксидазы хрена:** готовый к использованию. Козлиный анти-человеческий IgG, содержащий проклин (0,1%) в качестве консерванта. - **96Т: 1 бут., 16 мл.**
8. **Раствор хромоген/субстрата:** ТМВ, готовый к использованию.– **96Т: 1 бут., 15 мл.**
9. **Моющий буфер** (20X концентрат): разбавьте 1 часть концентрата + 19 частей деионизированной или дистиллированной воды. Содержит TBS, Tween и проклин (0,1%) в качестве консерванта – **96Т: 1 бут., 60 мл.**
10. **Стоп раствор:** готовый к использованию, содержит раствор 1N H₂SO₄ – **96Т: 1 бут., 15 мл.**

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Градуированный цилиндр (1 л).
2. Флакон (1л)
3. Таймер 0-60 минут.
4. Микропипетки способностью точного распределения объема 10-200 мкл (КВ меньше чем 3%).
5. Деионизированная или дистиллированная вода.
6. Бумажное полотенце.
7. Бутылка для промывания, полу-автоматическое устройство для промывания.
8. Микропланшетный ридер с одной или двойной длиной волны при фильтре 450 нм. Если используется двойная длина волны, установите фильтр 600-650 нм. Установите линейную спецификацию ридера согласно руководству по эксплуатации.
9. Тестовые пробирки для разбавления сыворотки.
10. Резервуар для уничтожения и дезинфекции (напр. 0,5% гипохлорид натрия).

Примечание: используйте только чистую, сухую посуду.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните невскрытый набор при 2-8⁰С. Тестовый набор может использоваться до окончания срока пригодности, указанном на этикетке набора.
2. Невскрытый микропланшет необходимо хранить при 2-8⁰С. Неиспользованные стрипы необходимо немедленно поместить в запечатанный пакет с осушителем и индикатором влаги и хранить при 2-8⁰С.
3. Хранить HRP конъюгат при 2-8⁰С.
4. Хранить калибратор, положительный и отрицательный контроль при 2-8⁰С.
5. Храните разбавитель сыворотки, субстратный буфер и 20X моющий буфер при 2-8⁰С.

6. Хранить раствор хромоген субстрат (ТМВ) при 2-8⁰С.
7. Храните 1X (разбавленный) моющий буфер при комнатной температуре (21-25⁰С) 5 дней или 1 неделю при 2-8⁰С.

Примечание: Если сохранить температуру хранения стабильной, реагенты и субстрат будет стабильный до окончания срока пригодности. Смотрите дату, указанную на этикетке набора. При изготовлении придерживались необходимых мер предосторожности для защиты реагентов от загрязнения и от бактериологических агентов. Защищайте реагенты этого набора от загрязнения.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

- Только для диагностики in vitro.
- Обращайтесь со всеми реагентами и образцами как с потенциально инфицированными.
- Компоненты этого набора тестировались на контроль качества соответственно серии набора. Не смешивайте компоненты разных серий, кроме раствора хромоген / субстрата, стоп раствора и моющего буфера. Разбавитель образцов типа I может использоваться с другими IgG наборами. Не смешивайте компоненты разных изготовителей.
- Не используйте реагенты после окончания срока пригодности.
- Все реагенты необходимо привести к комнатной температуре (21-25⁰) до начала теста. Забирайте только необходимый объем реагентов. Не вливайте реагенты обратно во флакон, поскольку может происходить загрязнение.
- Перед вскрытием флаконов калибратора и контроля, постучите по крышке, что б вся жидкость была на дне флакона.
- Используйте только дистиллированную или деионизированную воду и чистую посуду.
- Не давайте возможности ячейкам высохнуть; добавляйте реагенты немедленно после окончания шага промывания.
- Избегайте перекрестного загрязнения реагентов. Мойте руки до и после работы с реагентами.
- При ручном промывания ячейки необходимо промывать три раза. При автоматическом промывании необходимо промывать пять раз.
- Азид натрия подавляет активность конъюгата. Необходимы чистые наконечники для добавления конъюгата, что б азид натрия не попадал от других реагентов.
- Азид натрия может реагировать со свинцом и медью и формировать взрывоопасные вещества. При попадании, промойте большим количеством воды.
- Не пипетируйте ртом и избегайте попадания реагентов и сыворотки пациента на кожу.
- Если используется раствор гипохлорида (отбеливатель) в качестве дезинфицирующего вещества, избегайте попадания на рабочую поверхность, поскольку, существует возможность влияния на активность энзима.
- Избегайте контакта стоп раствора с кожей и глазами. В случае попадания, промойте большим количеством воды.
- **Внимание:** жидкие отходы при кислоте рН необходимо нейтрализовать до добавления их в

раствор гипохлорида (отбеливатель) для избегания формирования ядовитых газов.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. Обращайтесь с кровью и сывороткой как с потенциально инфицированными.
2. Оптимальное проведение данного теста зависит от использования свежих образцов сыворотки (чистой, не гемолизированной, не липемической, не иктерической). Минимальный объем сыворотки рекомендуется 50 мкл, поскольку необходимо повторение теста. Образцы следует собрать асептической венопункцией. Быстрое отделение от сгустков минимизирует гемолиз сыворотки.
3. Хранить сыворотку при 2-8⁰С если тестирование будет проводиться в течении двух дней. Если образцы будут храниться дольше, храните при – 20⁰С или ниже. Не используйте саморазмораживающую систему. Образцы, что хранились не должным образом или подверглись многочисленным циклам замораживания / размораживания, могут давать ложные результаты.
4. Если будет собрана парная сыворотка, сыворотка острых образцов должна быть взята немедленно после определения симптомов, второй образец необходимо собрать между 14-21 днем после забора сыворотки острых образцов. Два образца следует анализировать на том самом планшете для определения разницы. Если первый образец собран слишком поздно, значительная разница не будет определяться.

ОСНОВНАЯ ПРОЦЕДУРА

Приготовление к использованию

1. Все реагенты следует вынуть из рефрижератора и привести к комнатной температуре перед использованием (21-28⁰С). Поместите все реагенты в рефрижератор после использования.
2. Все образцы и контроли следует перемешать перед использованием.
3. Разбавьте 60 мл 20X моющего буфера тип I к 1,2 л дистиллированной или /и деионизированной водой. Перемешайте ячейки.

Процедура анализа

1. Вставьте необходимое количество стрипов в рамку для микропланшета. Используйте четыре определения для контролей и калибратора (один отрицательный контроль, два калибратора и один положительный контроль). Реагент бланка (РБ) необходимо использовать в каждом анализе. Проверьте требования обеспечения и ридера для правильной конфигурации для контролей /калибратора. Поместите неиспользованные стрипы в запечатанный пакет с осушителем и индикатором влаги, запечатайте и немедленно поместите в холодное место.

Пример конфигурации:

1A	RB	2A	Пациент 2
1B	NC	2B	Пациент 3
1C	Cal	2C	Пациент 4
1D	Cal	2D	Пациент 5
1E	Cal	2E	Пациент 6
1F	HPC	2F	Пациент 7

1G	LPC	2G	Пациент 8
1H	Пациент 1	2H	Пациент 9

RB – Реагент бланка – ячейка без сыворотки со всеми реагентами. Используется для бланка ридера.

NC – Отрицательный контроль

Cal – калибратор величины исключения

HPC – высоко положительный контроль

LPC – низко положительный контроль

- Разбавьте тестовую сыворотку, калибратор, положительный и отрицательный контроль 1:21 (напр., 10 мкл + 200 мкл) в разбавителе сыворотки. (При ручном разбавлении предлагается вносить сначала разбавитель сыворотки в тестовую пробирку, а потом добавить сыворотку пациента.)
- В отдельные ячейки внести 100 мкл соответствующих разбавленных контролей, калибратор и сыворотку пациента. Добавить 100 мкл разбавителя сыворотки в ячейку для бланка (A-1). Проверьте требования обеспечения и ридера для конфигурации ячейки реагента бланка.
- Инкубировать каждую ячейку при комнатной температуре (21-25°C) 20 минут + 2 минуты.
- Аспирировать или вытряхнуть жидкость с ячеек. При использовании полу-автоматического или автоматического устройства для промывания, добавьте 250-300 мкл разбавленного моющего буфера. Аспирируйте или вытряхните и переверните планшет вверх дном на бумажное полотенце для удаления всей жидкости. Повторите процедуру промывания 2 раза (для общего числа промывания 3) для ручного или полу автоматического промывания или четыре раза (для общего числа 5 промываний) для автоматического промывания. После окончательного промывания, промокните планшет на бумажное полотенце для удаления всей жидкости из ячеек.

Важное примечание: Относительно шагов 5-8 – недостаточное или излишнее промывание влияет на результаты анализа. Поэтому, рекомендуется использовать полу-автоматическое или автоматическое промывание для полного заполнения каждой ячейки (250-300 мкл). Всего необходимо пять промываний при автоматической процедуре. Полностью удаляйте моющий буфер после последнего промывания, поскольку, это имеет критическое значение для точности выполнения анализа. Также визуально удостоверьтесь, что в ячейках не было пузырей.

- Добавьте 100 мкл конъюгата в каждую ячейку, включая ячейку реагента бланка (A-1). Избегайте пузырей при добавлении, так как они могут провоцировать ложные результаты.
- Инкубируйте каждую ячейку 25±5 минуты при комнатной температуре (21-25°C).
- Повторите промывание как описано в шаге 5.
- Добавьте 100 мкл раствора хромоген / субстрата в каждую ячейку, включая ячейку реагента бланка (A-1), соблюдайте одинаковый порядок добавления в ячейки планшета.
- Инкубируйте 10-15 минуты при комнатной температуре (21-25°C).
- Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп раствора, придерживаясь того же порядка, что и

при добавлении хромоген / субстрата, включая ячейку реагента бланка (A-1). Легко постучите по внешней стороне планшета для смешивания всех компонентов ячеек. Подождите минимум 5 минут и считайте. Считывать можно на протяжении одного часа после добавления стоп раствора.

- Окрас, что развился, необходимо считать ELISA планшетным ридером при 450 нм. Если используется двойная волна, установите фильтр при 600-650 нм. Прибор необходимо настроить относительно воздуха. Реагент бланка должен быть меньше, чем 0,150 абсорбции при 450 нм. Если реагент бланка $\geq 0,150$, тест необходимо повторить. Настройте ридер согласно реагенту бланка и продолжайте считывать всю ячейку. Уничтожьте использованный планшет после считывания.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Чтоб анализ принимался как достоверный, необходимо выполнение следующих условий.

- Калибраторы и контроли должны анализироваться в каждом тесте.
- Реагент бланка (при считывании относительно воздуха) должен быть $< 0,150$ абсорбции (A) при 450 нм.
- Отрицательный контроль должен быть $< 0,250$ A при 450 нм (при считывании относительно реагента бланка).
- Каждый калибратор величины исключения должен быть $\geq 0,250$ A при 450 нм (при считывании относительно реагента бланка).
- Положительный контроль должен быть $\geq 0,500$ A при 450 нм (при считывании относительно реагента бланка).
- DAI рекомендует, что б положительный контроль при известной реактивности бал включен в каждый анализ, как часть программы контроля качества.
- Значение ISR (коэффициент иммунного статуса) для положительного и отрицательного контроля должны быть в своих соответствующих границах, указанных на флаконах. Если значения контролей не соответствуют диапазону, тест необходимо повторить.
- Если данные критерии не выполняются при повторении теста, обратитесь к производителю.

ИНТЕРПРИТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычисление

- Значение величины исключения – вычислите среднее ОП значение калибратора величины исключения трех определений калибратора величины исключения. Если любая из трех величин отличается более чем на 15 % от средней, откиньте эту величину и вычислите среднюю двух оставшихся.
- Фактор коррекции – для вычисления между дневного колебания активности анализа согласно комнатной температуре и времени, фактор коррекции вычисляется для каждой серии набора. Фактор коррекции напечатан на флаконе калибратора величины исключения.
- Значение величины исключения – значение величины исключения для каждого анализа определяется умножением фактора коррекции на среднее значение калибратора величины исключения, полученного в шаге 1.

4. Значение индекса – вычислите коэффициент иммунного статуса (ISR) для каждого образца делением значения ОП образца на значение ОП величины исключения, что получен в шаге 3.

Пример: ОП полученная для калибратора величины исключения = 0,38, 0,40, 0,42
Средняя ОП для калибратора величины исключения = 0,40
Фактор коррекции = 0,50
Значение ОП величины исключения =
= 0,50 * 0,40 = 0,20
ОП для сыворотки пациента = 0,60
Коэффициент иммунного статуса =
= 0,60 / 0,20 = 3,00

5. Максимальная линейность анализа равна ISR 3,18, поэтому значение ISR >3,18 должна подаваться как выше 3,18.

Анализ

1. ISR пациента интерпретируется следующим образом:

ISR	Результаты	Интерпретация
≤ 0,90	Отрицательный	Определяемый уровень антитела микоплазма пневмония IgG отсутствует; результаты не исключают недавнее выделение и сбор образцов до развития IgG.
0,91-1,09	Сомнительный	Образцы, что остаются сомнительными после повторного тестирования, должны тестироваться альтернативным методом, напр. иммунофлюоресценцией
≥ 1,10	Положительный	Указывает на наличие определяемого уровня антитела микоплазма пневмония

- 2 Для определения величины исключения анализа, 28 отрицательных сывороток тестировались DAi Микоплазма IgG ELISA тестом. Отрицательность и положительность образцов, что использовались для определения величины исключения анализа были определены другим ELISA методом. Среднее и стандартное отклонение ОП для сыворотки составило 0,19 и 0,077 соответственно. Положительный порог для анализа был определен добавлением среднего и 2 стандартных отклонений (0,19 + 2(0,077) = 0,34). Положительная сыворотка была титрирована для получения стабильного коэффициента пороговых значений для калибратора. Во всех последующих анализах, эта сыворотка тестировалась и анализ был калиброван умножением значения ОП калибратора на коэффициент величины исключения для получения величины исключения калибратора. Это значение потом вошло в 1,00. Для вычисления свойственной вариации в иммуноферментном анализе, значения 0,91-1,09 рассматриваются как сомнительные. Поэтому, значения ≤ 0,90 рассматриваются как

- отрицательные, а значения ≥ 1,10 рассматриваются как положительные.
- 3 Рекомендуется следующий метод для составления результатов: «Следующие результаты были получены DAi микоплазма IgG ELISA. Значения, полученные при других методах, не могут быть взаимозаменяемыми. Величина уровня IgG не может изменяться соответственно титру конечной точки».
4. Для оценки пары сыворотки на изменение уровня антитела, два образца должны тестироваться в дубликаты в одном анализе. Средний ISR для двух образцов (фаза острая и фаза выздоровления) должны быть выше 1,00 для оценки пары сыворотки на определение роста уровня антитела.
5. Дополнительный контроль качества для пары сыворотки: (смотрите примечание после основной процедуры). Для проверки восстановления и для острой фазы (тестируется в дубликаты) и для фазы выздоровления (тестируется в дубликаты), должны выполняться следующие критерии:
Острая1 ISR / Острая2 ISR = 0,8 до 1,2
Выздоровление1 ISR / Выздоровление 2 ISR = 0,8 до1,2
6. Сравните ISR пары, вычисляя следующим образом:
УРОВЕНЬ ((Средний ISR (второй образец) – Средний ISR (острый образец)) / Средний ISR (острый образец)) *100 = % ПОСТ УРОВНЯ ISR

% ПОСТ УРОВНЯ ISR	Интерпретация
< 46,0%	Нет видимого изменения уровня антитела. Нет очевидной недавней инфекции. Если предполагается активная болезнь, необходимо взять третий образец и анализировать как первый образец для видимого увеличения уровня антитела.
≥46,0%	Статистически указывает на определяемое изменение уровня антитела. Это идентифицирует тех индивидов, которые подверглись недавней или активной инфекции (реактивация, реинфекция или первичная инфекция, при которой образец острой фазы взят слишком поздно для демонстрации сероконверсии).

7. При оценке пары сыворотки, острая сыворотка должна быть ≤ 2,18, через максимальную линейность анализа.
8. При оценке пары сыворотки, необходимо определить попадает ли высокая абсорбция образцов в диапазон линейной спецификации спектрофотометра. Следуйте указаниям руководства по эксплуатации спектрофотометра.

ОГРАНИЧЕНИЕ

- Процедура должна проводиться в соответствии с инструкцией.
- Этот набор предназначен для измерения IgG антитела в образце сыворотки. Положительные результаты в новорожденных должны интерпретироваться с осторожностью, поскольку, материнский IgG передается пассивно от матери к плоду. Анализ IgM в основном более

информационный индикатор инфекции в детей до 6 месяцев.

- Образцы, собранные слишком рано могут не содержать определяемого уровня IgG. В этом случае рекомендуется проводить анализ IgM или образцы получить 14-21 позже и тестировать параллельно с оригинальным образцом для определения сероконверсии.
- Образцы, что остаются сомнительными после повторного тестирования, должны тестироваться альтернативным методом, напр. иммунофлюоресценцией. Если результат и дальше сомнительный, необходимо взять дополнительные образцы.
- Результаты одного образца не должны использоваться для диагностики недавней инфекции. Пара образцов (острая фаза и фаза выздоровления) должна быть собрана и проанализирована для наблюдения сероконверсии или значительного увеличения уровня антитела.
- Значения, полученные в этом анализе должны использоваться только в диагностических целях. Каждый врач должен интерпретировать результаты в соответствии с историей пациента, физическими данными и другими диагностическими процедурами.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua