

ЗМІСТ

1.	ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2.	ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	2
3.	АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	2
4.	СКЛАД НАБОРУ	3
5.	ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	4
6.	ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ	4
7.	ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	4
8.	УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ	5
9.	ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	6
10.	ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ	7
11.	ЛІТЕРАТУРА	8

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЯВЛЕННЯ IgG АНТИТІЛ ПРОТИ АНТИГЕНІВ *Mycoplasma spp.* В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ «*Mycoplasma IgG-ІФА*»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір «*Mycoplasma IgG-ІФА*» призначений для якісного визначення концентрації IgG антитіл проти антигенів *Mycoplasma spp.* в сироватці (плазмі) крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

1.2. Мікоплазми (*Mycoplasma*) є окремим класом мікроорганізмів. Через особливості метаболізму мікоплазми не ростуть або вкрай повільно ростуть на стандартних середовищах, що використовуються в бактеріологічних лабораторіях; це вимагає застосування серологічних методів для діагностики. В практичній медицині основну роль відіграють види *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*. Всі ці види несуть спільні антигенні детермінанти; крім того, значне перехрещення спостерігається з родинним видом *Ureaplasma urealyticum*. *Mycoplasma pneumoniae* викликає пневмонію, трахеобронхіт і бульозний менінгіт. Інші мікоплазми можуть викликати гострі та хронічні запальні захворювання сечостатевого тракту і бути причиною чоловічого та жіночого безпліддя.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення IgG антитіл проти антигенів *Mycoplasma spp.* ґрунтується на використанні непрямого твердофазного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізований антиген - *Mycoplasma*. Антитіла зі зразка зв'язуються з антигеном на поверхні лунки.

Комплекс, що утворився, виявляють за допомогою кон'югата мишачих моноклональних антитіл до IgG людини з пероксидазою хрину. У результаті утворюється зв'язаний із твердою фазою комплекс, що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) рідина в лунках забарвлюється. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації специфічних IgG антитіл проти антигенів *Mycoplasma spp.* Концентрація IgG антитіл проти антигенів *Mycoplasma spp.* в досліджуваних зразках розраховується за формулою, наведеною в Інструкції.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність. Використання високоочищеного препарату дозволяє досягти високої специфічності аналізу.

3.2. Відтворюваність.

Коефіцієнт варіації результатів визначення IgG антитіл проти антигенів *Mycoplasma spp.* у тому самому зразку сироватки (плазми) крові з використанням Набору «*Mycoplasma IgG-ІФА*» не перевищує 8.0%.

4. СКЛАД НАБОРУ

	Код компонента	Символ	Найменування	К-сть	Од.	Опис
1	P106Z	SORB MTP	Планшет 96-лунковий полістироловий, стріпований, готовий до використання	1	шт.	-
2	CQ106Z	CAL	Калібрувальна проба на основі трис-буфера (pH 7.2-7.4), що містить відомі кількості IgG антитіл проти антигенів <i>Mycoplasma spp.</i> , готова до використання (1мл)	1	шт.	прозора рідина синього кольору
3	CN106Z CP106Z	CONTROL- CONTROL+	Контрольні сироватки (негативна та позитивна) на основі сироватки крові людини з відомим вмістом IgG антитіл проти антигенів <i>Mycoplasma spp.</i> , готові до використання (по 1 мл кожна)	2	шт.	прозора безбарвна рідина і прозора рідина червоного кольору
4	T106Z	CONJ HRP	Кон'югат , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора рідина червоного кольору
5	S014Z	DIL	ІФА-буфер , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора рідина синього кольору
6	R055Z	SUBS TMB	Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ), готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
7	S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат розчину для відмивання , 26х-кратний (22 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
8	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
9	N003	-	Плівка для заклеювання планшета	2	шт.	-
10	K106I	-	Інструкція з використання Набору реагентів « <i>Mycoplasma</i> IgG-ІФА»	1	шт.	-
11	K106Q	-	Паспорт контролю якості Набору реагентів « <i>Mycoplasma</i> IgG-ІФА»	1	шт.	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. Всі компоненти Набору, за винятком стоп-реагенту (5.0% розчин сірчаної кислоти), у концентраціях, що використовуються, є нетоксичними.

Розчин сірчаної кислоти має подразнюючу дію; при роботі з ним потрібно уникати його розбризкування та потрапляння на шкіру і слизові оболонки. При потрапленні на шкіру і слизові оболонки уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.2. При роботі з Набором слід дотримуватись НПАОП 85.14-1.09-81. Правила влаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81).

5.3. При роботі з Набором необхідно користуватися одноразовими гумовими або пластиковими рукавичками, оскільки зразки крові людини слід розглядати як потенційно інфікований матеріал, здатний тривалий час зберігати і передавати віруси ВІЛ, гепатиту або будь-який інший збудник вірусної інфекції.

5.4. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густину вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостат, що підтримує температуру $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, що дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 10–250 мкл;
- циліндр мірний об'ємом 1000 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;
- папір фільтрувальний.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Перед проведенням аналізу компоненти Набору і досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати при кімнатній температурі ($+18...+25^{\circ}\text{C}$) не менше 30 хв.

7.2. Приготування планшета.

Відкрити пакет із планшетом і встановити в рамку необхідну кількість стрипів. Стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно заклеїти плівкою для заклеювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ протягом терміну придатності Набору.

7.3. Приготування розчину для відмивання.

Вміст флакона з концентратом розчину для відмивання (22 мл), перенести в мірний циліндр об'ємом 1000 мл, додати 550 мл дистильованої води та ретельно перемішати. У разі часткового використання Набору слід відібрати необхідну кількість концентрату розчину для відмивання і розвести дистильованою водою в 26 разів (до 1 мл концентрату розчину для відмивання додати 25 мл дистильованої води).

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «*Mycoplasma* IgG-ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі +2...+8°C протягом терміну придатності, який вказаний на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до +25 °C не довше 15 діб. Не допускається заморожування цілого Набору.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторях 45 досліджуваних зразків, 1 калібрувальної проби та 2 проб контрольних сироваток (всього 96 визначень).

8.3. У випадку часткового використанні Набору компоненти зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;
- ІФА-буфер, кон'югат, субстрат, стоп-реагент після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;
- калібрувальну пробу та контрольні сироватки, після відкриття флаконів, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C не довше 2 місяців;
- концентрат розчину для відмивання, що залишився невикористаним, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;
- готовий розчин для відмивання необхідно зберігати при кімнатній температурі (+18...+25°C) не довше 15 діб або при температурі +2...+8°C не довше 45 діб.

Важливе зауваження. Після використання реагенту закривайте флакон кришкою. Закривайте кожний флакон відповідною кришкою.

8.4. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, непрозору сироватку (плазму) крові, а також сироватку (плазму) крові, що містить азид натрію. У разі проведення аналізу не в день взяття крові, сироватку (плазму) слід зберігати при температурі -20°C. Не допускається повторне заморожування/розморожування зразків. Допускається аналіз сироваток, зберігання яких з моменту забору крові здійснювалося при температурі від +2°C до +8°C не довше 7 діб.

8.5. Дослідження зразків сироватки (плазми) крові людей, що отримували з метою діагностики або терапії препарати, до складу яких входять мишачі антитіла, може давати помилкові (підвищені) значення.

8.6. Під час використання Набору для проведення декількох незалежних серій аналізів слід мати на увазі, що для кожного визначення необхідне використання контрольної сироватки.

8.7. Не використовуйте компоненти з інших наборів або з аналогічних наборів інших партій.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стрипів – із розрахунку на кількість досліджуваних зразків в двох повторях та 6 лунок для калібрувальних проб та контрольної сироватки.
2	Внесіть у всі лунки планшета по 80 мкл ІФА-буфера.
3	Внесіть у відповідні лунки в двох повторях по 20 мкл калібрувальної проби та контрольних сироваток. В лунки, що залишилися, внесіть в двох повторях по 20 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові. Внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 15 хв. При додаванні досліджуваного зразка, що не містить гепарин чи ЕДТА, відбувається зміна забарвлення буфера з синього на червоний.
4	Обережно перемішайте вміст планшета круговими рухами на горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 30 хвилин при температурі +18...+25°C.
5	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 3 рази . При кожному відмиванні додавайте в усі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див. п. 7.3), струшуйте планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, а потім видаляйте рідину з лунок. Після завершення відмивання необхідно ретельно видаляти залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
6	Внесіть у всі лунки по 100 мкл кон'югату.
7	Заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета та інкубуйте його протягом 30 хвилин при температурі +18...+25°C.
8	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок та відмийте лунки 5 разів.
9	Внесіть у всі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину. Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно провести протягом 2-3 хв. Інкубуйте планшет в темряві при кімнатній температурі (+18...+25 °C) протягом 10–20 хвилин в залежності від швидкості розвитку синього забарвлення.
10	Внесіть в усі лунки з тією же швидкістю і у тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, по 100 мкл стоп-реагенту; при цьому вміст лунок забарвлюється в яскраво-жовтий колір.
11	Визначте величину оптичної густини (ОГ) вмісту лунок планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання ОГ вмісту лунок планшета необхідно провести протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра виставляйте за повітрям.

- 12 **Розрахуйте вміст IgG антитіл проти антигенів *Mycoplasma spp.* в досліджуваних зразках.**
1. Розрахуйте середнє ОГ калібратора;
 2. Помножте це середнє значення ОГ на коефіцієнт (O), значення якого вказано в Паспорті партії – отримайте граничне значення оптичної густини (ОГГ);
 3. Для кожного зразка обчисліть коефіцієнт К, що розраховується діленням ОГ зразка на ОГГ.
При **K>1.1 зразок позитивний**,
при **K<0.9 – негативний**.
при значенні К, що знаходиться в межах від 0.91 до 1.09 – результат у граничній зоні (+/-).

10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ

10.1. Ґрунтуючись на результатах досліджень, що проведені фахівцями ТОВ «ХЕМА», рекомендуємо скористатися нормами, наведеними нижче. Разом із тим, у відповідності до принципів GLP (Належної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна самостійно визначити параметри норми, які є характерними для обстежуваної популяції.

10.2. Деякі лабораторії на підставі результатів власних популяційних досліджень вводять «другий cut-off», розташований між анамнестичним («нормальним») та «високим» рівнем IgG-антитіл, характерним для реактивації або пізнього періоду первинної інфекції. Значення «другого cut-off» для вікових груп 8 міс-3 роки та старше 3 років наведені в Таблиці очікуваних значень.

Якщо значення К знаходиться в інтервалі від 1.1 до «другого cut-off», це може свідчити або про початковий період первинної інфекції, або про інфекцію, перенесену раніше. Щоб прояснити ситуацію, необхідно досліджувати повторно зразки крові того ж пацієнта, взяті через кілька тижнів. Наростання титру в повторному зразку свідчить про наявність інфекції. Якщо ж титр не наростає, це свідчить про відсутність активної інфекції та про анамнестичний характер антитіл.

Досліджувана група	Одиниці, К	
	Нижня межа	Верхня межа
Серонегативні	<0.1	0.9
Серопозитивні старші 3-х років	1.1	3.9
новонароджені*	<0.1	1.3
до 8 місяців*	<0.1	2.6
8 місяців – 3 роки	<0.1	2.1

*материнські антитіла

11. ЛІТЕРАТУРА

1. Maia I. L., Nicolau J. C., Machado M. de N., Maia L. N., Takakura I. T., Rocha P. R., Cordeiro J. A., Ramires J. A. – Prevalence of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae in different forms of coronary disease. Arq Bras Cardiol. 2009 Jun; 92(6): 405-11, 422-8, 439-45. English, Multiple languages.
2. Pereyre S., Renaudin H., Touati A., Charron A., Peuchant O., Hassen A. B., Bébéar C, Bébéar CM. – Detection and susceptibility testing of Mycoplasma amphoriforme isolates from patients with respiratory tract infections. Clin Microbiol Infect. 2009 Jul 15. [Epub ahead of print]
3. Ken B. Waites and Deborah F. Talkington – Mycoplasma pneumoniae and Its Role as a Human Pathogen. Clin. Microbiol. Rev., Oct 2004; 17: 697 – 728.

З питань якості Набору «***Mycoplasma IgG-ІФА***»

звертатися в ТОВ «ХЕМА» за адресою:

м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23

тел./факс: +38 (044) 422-62-16

email: info@xema.com.ua

www.xema-medica.com

Керівник відділу контролю якості ТОВ «ХЕМА»

Коваленко Еліна Володимирівна