

НАБІР ІФА
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ТА ЯКІСНОГО
ВИЗНАЧЕННЯ IgM АНТИТІЛ ПРОТИ
BORRELIA BURGDORFERI В СИРОВАТЦІ
ТА СМР (CSF)

3803-1, AeskuLISA Borrelia-LIQ IgM

Каталог. №: 3803-1

Методика від 11-05-2012

Кількість : 96

Версія 004

Виробник : AESKU. Diagnostics,
(Німеччина)



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

1. Призначення

AESKULISA Borrelia-LIQ IgM являє собою твердофазний імуоферментний аналіз для кількісного та якісного визначення IgM антитіл проти *Borrelia burgdorferi*. Тест пропонується для визначення IgM антитіл в напівкількісній формі в сироватці і СМР (спинномозковій рідині). Визначення антитіл виконується, щоб допомогти в діагностиці гострого та хронічного нейроборреліозу і для надійного визначення антитіл до *Borrelia*, вироблених інтратекально.

2. Клінічне застосування і принцип аналізу (Див. оригінал інструкції).

Принцип тесту

Відповідно до рекомендацій по розведенню (розділ 7) розбавлені зразки сироватки/СМР, вносять в лунки з внесеним антигеном. Специфічні антитіла зв'язуються з антигеном на поверхні мікропланшета. Незв'язані компоненти вимиваються. На другому етапі додаються анти-людські імуноглобуліни, кон'юговані з пероксидазою хрому (кон'югат). Ці імуноглобуліни зв'язуються з комплексом антиген-антитіло, створеним раніше. Зайвий кон'югат вимивається в другій стадії промивки. Визначення зв'язаних антитіл здійснюється за допомогою ферментативної кольорової реакції, яка зупиняється додаванням кислоти. Інтенсивність отриманого кольору відповідає концентрації антитіл у зразку.

Принцип розрахунку:

Тест заснований на твердофазному імуоферментному аналізі з визначенням кінцевої точки. Результати наведені в OD і можуть бути легко обчислені як ІНДЕКС шляхом ділення OD зразка на OD калібратора. Отримані значення повинні бути внесені в Програму Розрахунку поруч зі значеннями для альбуміну та загального IgG. файл програми розрахунку надається окремо безпосередньо від компанії AESKU.Diagnostics.

Коефіцієнти, описані вище, отримані з наступних формул:

1. $Q\ IgG = IgM\ CSF / IgM\ Сироватки$
2. $Q\ Альбуміну = Альбумін\ CSF / Альбумін\ Сироватки$
3. $Q_{spec} = NDX\ CSF / NDX\ Сироватки \times$ поправочний коефіцієнт. Поправочний коефіцієнт необхідно враховувати при різних розведеннях в сироватці крові та спинномозковій рідині.
4. $Q_{lim}\ IgM = 0.93 \times$ (радикал ($Q\ Альбуміну \times Q\ Альбуміну + 0.000006$)) – 0.0017
5. Поправочний коефіцієнт = Об'єм сироватки/об'єм СМР

3. Комплект поставки

Мають бути відновлені:

- 5х Буфер для зразків 1 флакон, 20 мл - 5х концентрований (білий ковпачок: світло-зелений розчин)
Містить: Тріс, NaCl, BSA, азид натрію <0,1% (консервант), абсорбенти РФ
Увага! Будь ласка, не плутайте буфер для зразків Borrelia-G (жовтий розчин) з буфером для зразків Borrelia-M (світло-зелений розчин) через додавання абсорбентів РФ в останньому випадку!
- 50х Промивний буфер 1 флакон, 20 мл - 50х концентрований (білий ковпачок: зелений розчин)
Містить: Тріс, NaCl, Твін 20, азид натрію <0,1% (консервант)

Готові до використання:

- Негативний Контроль 1 флакон, 1,5 мл (зелений ковпачок: безколірний розчин)
Містить: людську сироватку (розведена), азид натрію <0,1% (консервант)
- Калібратор СС 1 флакон, 1,5 мл (синій ковпачок: жовтий розчин)
Містить: людську сироватку (розведена), азид натрію <0,1% (консервант)
- Калібратори 6 флаконів, 1,5 мл кожен 0, 3, 10, 30, 100, 300 Од/мл
(Колір збільшується з концентрацією: жовті розчини)
Містить: людську сироватку (розведена), азид натрію <0,1% (консервант)
- Кон'югат 1 флакон, 15 мл IgM (зелений ковпачок: зелений розчин)
Містить: Анти-імуноглобуліни людини, кон'юговані з пероксидазою хрому
- Субстрат ТМВ 1 флакон, 15 мл (чорний ковпачок)
Містить: стабілізований ТМВ/Н₂О₂
- Стоп Розчин 1 флакон, 15 мл (білий ковпачок: безбарвний розчин)
Містить: 1 М соляної кислоти
- Мікропланшет 12 x 8-лункових смужок, які відокремлюються
Покриття див. пункт 1

Необхідні матеріали, що не постачаються:

Планшетний рідер з фільтром 450 нм і опційним референтним фільтром 620 нм (600-690 нм). Скляний посуд (циліндр 100-1000 мл), пробірки для розведення. Вортекс, піпетки прецизійні (10, 100, 200, 500, 1000 мкл) або регульована мультипіпетка (100-1000 мл). Мікропланшетний Пристрій для промивки (300 мкл повторювання або багатоканальна піпетка або автоматизована система), адсорбуючий папір.
Наші тести призначені для використання з очищеною водою відповідно до визначення Фармакопеї США (USP 26 – NF 21) та Європейської Фармакопеї (Eur.Ph. 4-е вид).

4. Зберігання та термін придатності

Зберігати всі реагенти і мікропланшет при температурі 2-8 °C/35-46 °F, в оригінальній упаковці. **Реагенти і Мікропланшет повинні використовуватися тільки в межах терміну придатності, зазначеного на кожному компоненті. Уникайте інтенсивного впливу світла на ТМВ розчин. Зберігайте Мікропланшети в призначеній для цього фользі, в тому числі з осушувачем, і щільно закривайте.**

5. Заходи безпеки використання

5.1 Небезпека для здоров'я

Цей продукт призначений тільки ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO. Таким чином, тільки персонал, навчений і спеціально інформований щодо методів діагностики в пробірці, може проводити аналіз. Хоча цей продукт не вважається особливо токсичним або небезпечним в умовах нормального використання, притримуйтеся наступних заходів для максимальної безпеки:

Рекомендації та заходи безпеки

Цей комплект містить потенційно небезпечні компоненти. Хоча реагенти не класифіковані як подразник для очей і шкіри, ми рекомендуємо уникнути контакту з очима та шкірою і носити одноразові рукавички.
Не паліть, не їжте і не пийте при роботі з набором.
Не піпетувати ротом.
Весь вихідний людський матеріал, що використовується для деяких реагентів цього набору (контролі, стандарти, наприклад) був протестований схваленими методами, і був негативним до HbsAg, гепатиту С та ВІЛ 1. Проте, жоден тест не може гарантувати відсутність вірусних агентів у таких матеріалах повністю. Таким чином, поводитись з контролями, стандартами і зразками пацієнтів як з потенційним джерелом інфекційних захворювань і відповідно до національних вимог.

5.2 Загальні зауваження щодо використання

Не змішуйте і не заміняйте реагенти або Мікропланшети з різних лотів. Це може привести до змін в результатах.
Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-32 °C/68-89.6 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої інкубаційної схеми для оптимального виконання тесту.

Певний клінічний діагноз не повинен ґрунтуватися на результатах тільки проведеного тесту, але має бути зроблений лікарем після оцінки всіх клінічних та лабораторних досліджень.

Діагноз повинен бути перевірений з використанням різних методів діагностики.

6. Відбір проб, Використання та зберігання

Використовуйте переважно зібрані нещодавно зразки сироватки. Забір крові і СМР повинен проводитись відповідно до державних вимог.

Не використовуйте іктеричні, ліпемічні, гемолізовані або бактеріально забруднені зразки. Сироватка з частками повинна бути очищена центрифугуванням з низькою швидкістю (<1000 x g). Зразки крові повинні бути зібрані в чисті, сухі і порожні пробірки. Після сепарації, зразки сироватки слід використовувати відразу, зберігати щільно закритими при температурі 2-8 °C/35-46 °F до трьох днів і замороженими при -20 °C/-4 °F для більш тривалих періодів.

7. Процедура аналізу

7.1 Підготовчі заходи перед піпетуванням

Розвести концентровані реагенти:

Розвести концентрований буфер для взірців 1:5 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 80 мл).

Розвести концентрований Промивний буфер 1:50 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 980 мл).

Промивання:

Підготувати 20 мл розведеного промивного буфера (1x) на 8 лунок або 200 мл на 96 лунок

Наприклад, 4 мл концентрату плюс 196 мл дистильованої води.

Автоматизоване промивання:

Врахувати надлишкові обсяги, необхідні для налаштування приладу, і мертві обсяги для автоматизованого піпетування.

Ручне промивання:

Видалити рідини з лунки перекиданням планшета. Постукати рамкою з мікролунками енергійно на чистий адсорбуючий папір. Внести 300 мкл розведеного промивного буфера в кожну лунку, почекати 20 секунд. Повторити всю процедуру ще два рази.

Мікропланшети:

Розрахуйте кількість лунок, необхідних для випробування. Видалити зайві лунки з рамки, помістити в пакет і зберігати разом з осушувачем, (2-8 °C/35-46 °F).

7.2. Розведення зразків:

Ми рекомендуємо наступні вихідні розведення:

Сироватка: 1:100

СМР: 1:4

Індекс-значення (NDX), необхідні для розрахунку, не повинні бути вище, ніж 4, щоб підтримувалась лінійність вимірювань. Ця порада буде видаватись автоматично за допомогою програми розрахунку. У таких випадках зразок повинен бути розведений.

7.2 Проведення тестування

- Внесіть 100 мкл Cut-off Калібратора, Негативного контролю і розведеної сироватки кожного пацієнта в призначені лунки (Див. схему піпетування, яка додається)
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.
- Вимийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл кон'югату в кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.
- Вимийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл ТМБ субстрат в кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F, захищеному від інтенсивного світла.
- Внесіть 100 мкл стоп розчину в кожну лунку, використовуючи той же порядок, як при піпетуванні субстрату.
- Інкубувати 5 хвилин мінімум.
- Агітувати пластину ретельно протягом 5 сек.
- Зчитати абсорбцію при 450 нм (опційно 450/620 нм) протягом 30 хвилин.
- Внесіть розрахункові значення NDX (індекс) у відповідну колонку в Програмі розрахунку
- Значення індексу антитіл буде розраховуватись автоматично.

8. Інтерпретація

Оцінку аналізу проводили з використанням стандартної кривої. Інструкції до використання СМР/Сироватки засновані на значеннях індексу. Ці індекс-значення корелюють з кількісними величинами, отриманими за стандартною кривою. Таким чином, використання значень NDX для розрахунків дає аналогічні результати в порівнянні з результатами розрахунків з використанням кількісних значень стандартної кривої. Тому калібратор Cut-off піпетується двічі для

подвійних визначень і відповідні значення ОЩ зразків діляться на значення ОЩ калібратора.

Програма Розрахунку автоматично бере до уваги порогові значення, так що аномальні значення індексу антитіл не розраховуються. Ці порогові значення були встановлені при оцінці набору з панелями конкретних зразків. Для підтвердження значень індексу антитіл (Als) зразки сироватки розбавляють до вмісту імуноглобуліну в зразках СМР і вимірюються паралельно.

Значення індексу повинні бути занесені в Програму розрахунку, як описано в розділі 2. Крім того, відповідні значення альбуміну та загального IgM повинні бути внесені поруч зі значеннями розведення зразків, які використовуються. Програма автоматично розраховує індекс антитіл (AI). Тільки ті значення індексу антитіла будуть обчислені, що відповідають зазначеним вище пороговим значенням. Значення індексу антитіла вище 1.5 мають розглядатися як знак на виробництво антитіл всередині ЦНС.

9. Технічні дані

Матеріал зразка:	сироватка/рідина
Обсяг зразка:	100 мкл зразка, розведеного
Загальний час інкубації:	90 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F
Діапазон калібрування:	0-300 Од/мл
Аналітична чутливість:	1.0 Од/мл
Зберігання:	при температурі 2-8 °C/35-46 °F використовуйте тільки оригінальні флакони
Кількість визначень:	96 тестів

10. Дані продуктивності

10.1 Аналітична Чутливість

Тестування буфера для зразків 30 разів на AESKULISA *Borrelia*-LIQ дало аналітичну чутливість 1.0 Од/мл.

10.2 Специфічність і чутливість

Перехресна реактивність до інших аутоантігенів не спостерігалась. Чутливість набору становить >95% в порівнянні з відомим імунним статусом. Клінічно визначені сироватки демонструють специфічність >96% для IgG/IgM.

10.3 Лінійність

Обрані сироватки тестувались з цим набором і було встановлено лінійність розведення. Тим не менше, через неоднорідність характеру людських аутоантитіл можуть існувати зразки, що не підлягають цьому правилу.

№ Зразка	Фактор розведення	Виміряна концентрація (Од/мл)	Очікувана концентрація (Од/мл)	Відновлення (%)
1	1/100	449.5	470.0	95.6
	1/200	255.3	235.0	108.6
	1/400	125.1	117.5	106.4
	1/800	55.9	58.8	95.1
2	1/100	233.0	230.0	101.3
	1/200	113.8	1150.0	98.9
	1/400	63.1	57.5	110.0
	1/800	26.2	28.8	91.1

10.4 Точність

Для визначення точності аналізу, мінливість (всередині і між серіями) оцінювали шляхом аналізу його відтворюваності на трьох відібраних зразках сироватки, щоб представити діапазон в порівнянні зі стандартною кривою.

Intra-Assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	26.0	6.7
2	151.9	4.7
3	276.5	7.7

Inter-Assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	27.6	6.2
2	153.0	7.4
3	284.0	5.1

10.5 Калібрування

Через брак міжнародного еталонного калібрування цей аналіз відкалібрований в довільних одиницях (Од/мл). *Borrelia*-Liq тест використовує значення індексу для визначення зразків (див. розділ 2.)

ДОДАТОК А: Схема піпетування

		Quantitative Auswertung											
		1	2	3	4	5	6						
A	NC												
B	NC												
C	CC												
D	CC												
E	P1												
F	L1												
G	P2												
H	L2												

NC: негативний контроль
 CC: Калібратор Cut-off
 P1: пацієнт 1
 L2: Пацієнт 1 CMP



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
www.diameb.com

Додаток В: Процедура випробування

