

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА К MYCOPLASMA PNEUMONIAE

### 8042-2, Mycoplasma pneumonia IgG

Каталог. № : 8042-2

Методика от 10-10-2009

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Анализ	Mycoplasma Pneumonia IgG
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конъюгированный пероксидазой "сэндвич"-ИФА
Диапазон обнаружения	Положительный и отрицательный контроль
Образец	10 мкл сыворотки
Специфичность	95%
Чувствительность	450 нм
Общее время	~ 60 мин.
Срок годности	12-14 мес.

#### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор *Mycoplasma pneumonia IgG* компании ДАИ является ферменто-связанным иммунсорбентным анализом ИФА, предназначенный для качественного определения антител класса IgG в человеческой сыворотке к антигену *Mycoplasma pneumoniae*. Анализ анти-микоплазмы IgG ДАИ может использоваться как средство диагностики инфекции *Mycoplasma pneumoniae* у взрослых. Анализ высокой сложности.

#### ВВЕДЕНИЕ

Микоплазма пневмония является распространенным маленьким организмом. В людей он обычно найден в горле и легких и является чувствительным к анти-микробиологическим агентам, что подавляют синтез протеинов. Распространение инфекции микоплазмы зависит от закрытого и длительного контакта между людьми и передается через респираторные пути. Инфекция микоплазмы может быть бессимптомная или приводить к заболеванию верхних респираторных путей или к атипичической пневмонии. Очень тяжело отличать пневмонию от вирусных заболеваний только клиническими средствами. Лабораторные тесты как изоляция, ИФА серология являются полезными при диагностике.

#### ПРИНЦИП ИФА

Ферменто-связанный иммуноферментный анализ (ИФА) 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 ТМБ. Если антитело специфическое к антигену присутствует в сыворотке пациента, развивается желтый окрас. Окрас, пропорциональный концентрации антитела в сыворотке, может считываться подходящим спектрофотометром или микропланшетным считывателем.

#### ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

##### Поставляемые материалы

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

**Примечание:** Все взаимодействующие реагенты содержат азид натрия в качестве консерванта 0.1% (в/о). Следующие компоненты не зависят о номера партии набора и могут использоваться

взаимозаменяемо в ИФА анализах: ТМБ, стоп-раствор и промывочный буфер.

1. **Планшет** 96 лунок, распределенных в 12 1x8 стрипов, покрытых озвученным ультразвуком, инактивированием приготовленной штаммом FN пневмонии. Стрипы упакованы в держателе и герметично закрыты в пакете с осушителем.
2. **Конъюгат** Конъюгированный (пероксидазой хрена) козлий анти-человеческий IgG (специфическая  $\mu$ -цепочка). Готовый к использованию. Один 15 мл флакон с белым колпачком.
3. **Положительный контроль** (человеческая сыворотка). Один 0,35 мл флакон с красным колпачком.
4. **Калибратор** (человеческая сыворотка). Один 0,5 мл флакон с синим колпачком.
5. **Отрицательный контроль** (человеческая сыворотка). Один 0,35 мл флакон с зеленым колпачком.
6. **Разбавитель образца** Одна 30 мл бутылка (синий колпачок). Содержащий Твин-20. альбумин бычей сыворотки, фосфат-буферизованный солевой раствор и козлий анти-человеческий IgG (специфическая  $\gamma$ -цепочка), (pH 7.2+/-0.2). Пурпурный раствор, готовый к использованию. Примечание: перед использованием хорошо взболтать.
7. **ТМБ** Одна 15 мл янтарная бутылка (янтарный колпачок), содержащая 3,3,5,5-тетраметилбензидин (ТМБ). Готовый к использованию. Содержит ДМСО < 15% (в).
8. **Стоп раствор** Одна 15 мл бутылка (красный колпачок), содержащая 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,7 M HCl. Готовый к использованию.
9. **Концентрат промывочного буфера (10x)** разбавить 1 часть концентрата + 9 частей деионизированной или дистиллированной воды. Одну 100 мл бутылку (прозрачный колпачок, содержащую 10x концентрированный фосфат-буферизованный солевой раствор и Твин-20 (синий раствор). Примечание: 1x раствор имеет pH 7.2+/-0.2.

#### Примечание:

1. Перечень составляющих набора с указанием информации по партиям находится внутри набора.
2. Вкладыш упаковки с инструкциями по применению.

#### Необходимые, но не поставляемые материалы

- Резервуары реагентов для многоканальных пипеток, пробирки реагентов для разбавления сыворотки.
- Бутылка для промывания или промывочная микролуночная система.
- Деионизированная или дистиллированная вода, мерная колба (1 л).
- Серологические пипетки, одноразовые наконечники для пипеток, бумажные полотенца, лабораторный таймер для наблюдения за этапами инкубации.
- Резервуар для уничтожения и дезинфекции (напр. 10% бытового отбеливателя, 0,5% гипохлорид натрия).
- Микротитрационный планшет-ридер (450 нм).
- Микротитрационный планшетный вошер.

#### УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. Храните невскрытый набор при 2-8°C.
2. Стрипы покрытых микролунок: хранить при 2-8°C. Неиспользованные стрипы необходимо немедленно поместить в запечатанный пакет с осушителем и хранить в соответствующий условиях. Стрипы стабильны 60 дней после вскрытия пакета и его запечатывания, и полоска индикатора на пакете с осушителем остается синей.
3. Конъюгат: хранить при 2-8°C. НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ.
4. Калибратор, положительный и отрицательный контроль: хранить при 2-8°C.
5. ТМБ: хранить при 2-8°C.
6. Концентрат промывочного буфера (10X): Хранить между 2 и 25°C. Разбавленный промывочный буфер (1x) стабилен при комнатной температуре (20-25°C) в течение 7 дней или 30 дней при 2-8°C.
7. Разбавитель образца: хранить при 2-8°C.
8. Хранить раствор хромоген субстрат (ТМБ) при 2-8°C.
9. Стоп-раствор: хранить при 2-8°C.

#### СБОР ОБРАЗЦОВ

1. Соблюдать рекомендации NCCLS для хранения образцов крови. Обращайтесь с кровью и сывороткой как с потенциально инфицированными.
2. Ни одна из известных методик исследования не может дать полной гарантии, что образцы человеческой крови не способны передавать инфекции. Поэтому все дериваты крови должны считаться потенциально инфекционными.
3. В настоящем анализе должна использоваться только свежесобранная и должным образом хранящаяся сыворотка, полученная утвержденной асептической процедурой

- венепункции. Не должны добавляться антикоагулянты или консерванты. Избегать использования гемолизированных, липемических или бактериологически загрязненных сывороток.
- Хранить образец при комнатной температуре не более чем 8 часов. Если исследование не проводится в течение 8 часов, сыворотки могут храниться при 2-8°C не более 48 часов. Если образцы будут храниться дольше, храните при -20°C или ниже. Не используйте саморазмораживающую систему. Образцы, что хранились не должным образом или подверглись многочисленным циклам замораживания / размораживания, могут давать ошибочные результаты.

#### ПРОЦЕДУРА

- Извлеките отдельные компоненты из места хранения и позвольте им достичь комнатной температуры (20-25°C).
- Определите необходимое количество микролунок. Используйте шесть определений контроля/калибратора (один бланк, один отрицательный контроль, три калибратора и один положительный контроль) в процедуре. Реагент бланка необходимо использовать в каждой процедуре анализа. Проверьте требования программного обеспечения и ридера для правильной конфигурации контролей /калибратора. Возвратите неиспользованные стрипы в герметично закрываемый пакет с осушителем и индикатором влаги, запечатайте и немедленно положите на хранение при 2-8°C.

Пример конфигурации планшета:

A	Бланк	Пациент 3
B	Отриц. контроль	Пациент 4
C	Калибратор	И т.д.
D	Калибратор	
E	Калибратор	
F	Полож. контроль	
G	Пациент 1	
H	Пациент 2	

- Проведите разбавление 1:21 (напр., 10 мкл сыворотки + 200 мкл разбавителя образца. Примечание: перед использованием хорошо встряхнуть) отрицательного контроля, калибратора, положительного контроля и каждой сыворотки пациента.
- В отдельные лунки внести 100 мкл каждого разбавленного контроля, калибратора и образца. Убедитесь, что образцы должным образом перемешаны. Для каждого образца используйте отдельный наконечник.
- Добавить 100 мкл разбавителя образца в лунку для бланка (A-1). Проверьте ПО и требования к считывателю для правильной конфигурации лунки реагента бланка.
- Инкубировать планшет при комнатной температуре (20-25°C) 25 минут +/- 5 минут.
- Промойте микролуночные стрипы 5х.

#### A. Ручная процедура промывки:

- Энергично встряхните жидкость из лунок.
- Заполните каждую лунку промывочным буфером. Удостоверитесь в отсутствии в лунках воздушных пузырьков.
- Повторите этапы а. и б. чтобы в общем количестве провести 5 промываний.
- Встряхните промывочный раствор из всех лунок. Переверните планшет на бумажное полотенце и жестко постучите, чтобы удалить из лунок любой остаток промывочного раствора. Осмотрите планшет, убедившись в отсутствии остатка промывочного раствора. В конце каждого рабочего дня собирайте промывочный раствор в емкость для отходов, и обрабатывайте гипохлоритом натрия 0.5% (отбеливателем).

#### B. Автоматизированная процедура промывки:

- При использовании автоматизированной промывочной установки, отрегулируйте объем распределения на 300-350 мкл/лунку. Настройте цикл промывки на 5 промывок без задержки между промывками. Извлеките микротитрационный планшет из промывателя, переверните планшет на бумажное полотенце и жестко постучит, чтобы удалить из лунок любой остаток промывочного раствора.
- Добавьте 100 мкл конъюгата в каждую лунку, включая лунку бланка, в том же темпе и порядке как добавлялись образцы.
  - Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25°C) в течении 25 +/- 5 минут.
  - Промойте микролуночки, следуя процедуре в этапе 7.
  - Добавьте 100 мкл раствора субстрата ТМВ в каждую лунку, включая лунку бланк реагента, в том же темпе и порядке как добавлялись образцы.
  - Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25°C) в течении 10-15 минут.

- Остановите реакцию добавлением 50 мкл стоп раствора в каждую лунку, включая лунку бланк реагента, в том же темпе и порядке как добавлялся ТМВ. Положительные образцы из синего цвета станут желтыми. После добавления стоп раствора постучите по планшету несколько раз, убедившись, что образцы полностью смешаны.
- Настройте считывающее устройство для считывания при длине волны 450 нм и измерьте оптическую плотность (ОП) каждой лунки против бланка реагента. Планшет необходимо считать в пределах 30 минут после добавления стоп раствора.

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Во время каждой процедуры анализа калибратор должен анализироваться в трех экземплярах. Бланк реагент, отрицательный и положительный контроль должны также быть включены в каждом анализе.
- Вычислите среднее значение трех лунок калибраторов. Если любое из трех значений отличается больше чем на 15% от среднего, отбросьте это значение, и вычислите среднее остальных двух значений.
- Среднее значение ОП калибратора и значений ОП положительного и отрицательного контролей должно находиться в пределах следующих диапазонов:

#### Диапазон ОП

Отрицательный контроль	≤ 0.250
Калибратор	≥ 0.300
Положительный контроль	≥ 0.500

- ОП отрицательного контроля, разделенная на среднюю ОП низко положительного стандарта должна составлять ≤ 0.9.
- ОП положительного контроля, разделенная на среднюю ОП низко положительного стандарта должна составлять ≥ 1.25.
- Если значения контролей не находятся в пределах вышеупомянутых диапазонов, анализ следует считать недействительным, и его необходимо повторить.

- Положительный и отрицательный контроли предназначены для контроля существенного несоответствия реагента и не гарантирует точности в пороговом диапазоне анализа.
- В соответствии с рекомендациями или требованиями местных, государственных и/или федеральных правил или аккредитованных организаций, могут анализироваться дополнительные контроли.
- За рекомендациями практики контроля качества смотрите документ C24 NCCLS: Статистический контроль качества при количественных измерениях.

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

##### A. ВЫЧИСЛЕНИЕ

##### 1. Коэффициент коррекции

Значение предела обнаружения ОП для положительных образцов было определено производителем и откорректировано по отношению к калибратору. Коэффициент коррекции (КК) дает возможность определить пороговое значение для положительных образцов и исправить незначительные ежедневные отклонения в результатах анализа. КК определяется для каждой партии компонентов набора в перечне компонентов в упаковке набора.

##### 2. Пороговое значение ОП

Для получения порогового значения ОП умножьте КК на среднее значение калибратора, определенное выше.

(КК x среднее ОП калибратора = пороговое значение ОП).

##### 3. Значения коэффициента или коэффициенты ОП

Вычислите значение коэффициента или коэффициент ОП для каждого образца путем деления значения его ОП на предел обнаружения ОП из этапа 2.

Пример:

Среднее ОП калибратора = 0.793

Коэффициент коррекции (КК) = 0.25

Пороговое значение ОП = 0.793 x 0.25 = 0.198

ОП неизвестного образца = 0.432

Коэффициент значения образца или коэффициент ОП = 0.432 / 0.198 = 2.18

##### B. Интерпретации:

##### Отрицательный ≤ 0.90

*IgG антител к Mycoplasma pneumoniae не обнаружено. Демонстрирует текущую уязвимость иммунитета к Mycoplasma pneumoniae; результат не исключает недавнего ее влияния и забора исследуемого образца перед развитием IgG. Этот тип антител рекомендуется для определения текущей инфекции.*

##### Сомнительный 0.91 - 1.09

*Необходимо повторить анализ образцов. Уязвимость иммунитета невозможно оценить. Образцы, которые остаются*

сомнительными после повторного исследования должны исследоваться альтернативным методом, напр., иммунофлюоресцентным анализом. Если результаты продолжают оставаться сомнительными после дальнейшего исследования, необходимо еще раз сделать забор образца.

#### **Положительный $\geq 1.10$**

Значительный уровень определяемых антител класса IgG к *Mycoplasma pneumoniae* указывает на текущую или недавнюю инфекцию.

1. В полученных результатах коэффициент ОП  $\leq 0.90$  не указывает на определяемый уровень антител класса IgG к *Mycoplasma pneumoniae*. Нерактивный результат указывает на отсутствие текущей или предыдущего инфицирования *Mycoplasma pneumoniae*, определяемого настоящей набором.
2. В полученных результатах коэффициент ОП  $\geq 1.10$  является реактивным к антителам класса IgG к *Mycoplasma pneumoniae*. Реактивный результат анализа указывает на активное или недавнее инфицирование *Mycoplasma pneumoniae*, определяемого настоящей набором.
3. Образцы со значениями коэффициента ОП в сомнительном диапазоне (0.90 – 1.09) должны анализироваться повторно. Образцы, которые остаются сомнительными после повторного анализа должны исследоваться альтернативной серологической процедурой (методом иммунофлюоресценции).

**Примечание:** Эффективность данного анализа анализировались на примере образцов с положительными антителами в организмах, которые связаны с респираторными болезнями (грипп А и В, ЦМВ, С. *Pneumonia*, парагрипп), и близкие к микоплазме серовары, которые перекрестно реагируют с *Mycoplasma pneumoniae*. Исследования перекрестной реактивности этих организмов настоящей системой анализа не проводилось.

#### **ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ**

1. Для диагностического использования *in vitro*.
2. При обращении с лабораторными реагентами необходимо соблюдать стандартные предосторожности. В случае контакта с глазами, промойте немедленно большим количеством воды и обратитесь за медпомощью. Носите соответствующую защитную одежду, перчатки, и защитное средство для глаз/лица. Не вдыхайте пар. Уничтожайте отходы, соблюдая все местные, и государственные законы.
3. Лунки планшета ИФА не содержат жизнеспособных организмов. Однако, полоски должны рассматриваться как **ПОТЕНЦИАЛЬНО БИООПАСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ** и требуют соответствующего обращения.
4. Контроли человеческой сыворотки - **ПОТЕНЦИАЛЬНО БИООПАСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**. Исходные материалы, из которых эти продукты были получены, были подтверждены одобренным методами анализа. Поскольку никакой метод анализа не может полностью гарантировать отсутствие возбудителей инфекций, эти продукты требуют обращения с соблюдением 2 уровня биологической опасности как рекомендуется при любой потенциально инфекционной человеческой сыворотке или образце крови.
5. Разбавитель образца, контроли, промывочный буфер, абсорбент и конъюгат содержат азид натрия в концентрации 0.1 % (w/v). Азид натрия считается таким, который образует азиды свинца и меди во внутренней канализации лаборатории. Что может вызвать взрыв при ударе. Во избежание этого, тщательно промойте раковину водой после утилизации раствора с азидом натрия.
6. Четкое следование определенному времени и температуре инкубаций важно для точных результатов. **Все реагенты перед началом анализа должны быть приведены к комнатной температуре (20-25°C)**. Непосредственно после использования неиспользованные реагенты верните в температуру охлаждения.
7. Неправильное промывание приводит к ошибочно положительным или ошибочно отрицательным результатам. Убедитесь, что в планшетах не осталось любого остатка промывочного раствора перед добавлением конъюгата или раствора субстрата. Не позволяйте лункам высыхать между инкубациями.
8. Стоп раствор ТОКСИЧЕН. Причиняет ожоги. Токсичен при вдыхании, при контакте с кожей и при заглатывании. При несчастном случае или при плохом самочувствии немедленно обратитесь за медпомощью.
9. ТМВ раствор ВРЕДЕН. Раздражителен для глаз, дыхательной системы и кожи.
10. Концентрат промывочного буфера является РАЗДРАЖИТЕЛЕМ. Раздражителен для глаз, дыхательной системы и кожи.

11. Не оставляйте на дне планшета остатков жидкости и/или следов пальцев, которые могут изменять считываний оптической плотности (ОП).
12. Разбавление или примешивание этих реагентов может дать ошибочные результаты.
13. Реагенты от других источников или изготовителей не должны использоваться.
14. ТМВ раствор должен быть бесцветным, очень светло желтым, очень светло зеленым или очень светло синим во время использования. Загрязнение ТМВ с конъюгатом или другими окислителями преждевременно вызывает изменение цвета. Не используйте ТМВ, если это отчетливого синего цвета.
15. Никогда не пипетируйте ртом. Избегайте контакта реагентов и образцов пациентов с кожей или слизистыми оболочками.
16. Избегайте микробиологического загрязнения реагентов. Могут быть получены неправильные результаты.
17. Перекрестное загрязнение реагентов и/или образцов может вызвать ошибочные результаты.
18. Многоцветная стеклянная посуда должна быть вымыта и и полностью ополоскана, чтобы освободиться от всех детергентов.
19. Избегайте брызг или образования аэрозолей.
20. Не подвергайте реагенты сильному свету в течение хранения или инкубации.
21. Приводя микролуночные полоски и держатель к комнатной температуре перед вскрытием, защитит защитный мешочек лунки от конденсации.
22. Промывочный раствор необходимо собрать в емкость для отходов. Обработайте раствор для отходов 10% хозяйственным отбеливателем (0,5% гипохлоридом натрия). Избегайте воздействия испарений отбеливателя на реагенты.
23. Предостережение: Жидкие отходы в кислоте рН должны быть нейтрализованы перед добавлением к отбеливающему веществу.
24. Не использовать планшет ИФА, если полоска индикатора на мешочке высушивающего средства превратилась из синего цвета в розовый.
25. Не позволяйте конъюгату вступать в контакт с емкостями, которые, возможно, прежде содержали растворы, имеющие в своем составе азид натрия как консервант. Остаточные количества азиды натрия могут уничтожить ферментную деятельность конъюгата.
26. Не подвергайте никакой из реагентов воздействию растворов, содержащих отбеливающее вещество. Остаточное количество отбеливающего вещества (гипохлорида натрия) может уничтожить биологическую активность многих реагентов из этого набора.

#### **ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ**

1. Диагноз не должен ставиться на основании единственного результата анти-микоплазмы. Результаты анализа для анти-микоплазмы должны интерпретироваться в сочетании с клинической оценкой и результатами других диагностических процедур.
2. При исследовании специфического образца происходит рано в течение первичной инфекции, никаких обнаруживаемых антител класса IgG не может наблюдаться. Если есть подозрение на инфекцию микоплазмы, второй образец должен быть взят по крайней мере четырнадцать днями позже.
3. Использование гемолитических, липемических, бактериально загрязненных или инактивированных высокой температурой образцов нужно избегать. Могут получаться ошибочные результаты.
4. Рабочие характеристики анализа не были установлены для других матриц кроме сывороток.
5. Единственный положительный результат указывает только на предыдущую иммунологическую предрасположенность. И уровень реактивности антител и класса антител могут потребоваться для определения активной инфекции или степени тяжести болезни.
6. Отрицательные результаты не исключают болезни, сопутствующей *Mycoplasma pneumoniae*.
7. Длительное наличие или отсутствие антител не может использоваться для определения успешности или неэффективности терапии.
8. Скрининговое обследование группы людей не должно проводиться. Исследование должно проводиться только при наличии клинических характеристик или предполагаемом расположении к болезни.
9. Эффективность данного набора не проверялась на исследовании новорожденных и иммунокомпромиссных пациентах.

#### **ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ**

Симптоматическое инфицирование, свойственное для этого микроорганизма, наиболее часто встречается у детей и подростков

(в возрасте 2-19 лет). Один отчет продемонстрировал, что 97-98% сывороток здоровой взрослой популяции оказались нереактивными к антителу *Mycoplasma pneumoniae* путем исследования методом комплементарной фиксации (CF) и иммунофлюоресцентного анализа (IFA). Каждая лаборатория должна установить свои собственные результаты, основываясь на типичной оценке популяции.

Клиническое исследование настоящего изделия включило 205 выборочных препаратов, которые были отправлены в референтную лабораторию северовостоке США для ежедневного серологического анализа *Mycoplasma pneumoniae*. Ссылаясь на эту популяцию 92/205 (45%) оказались отрицательными, 21/205 (10%) были сомнительными, и 92/205 (45%) были реактивными.

#### **РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

*(Данные сравнительного исследования и воспроизводимости см. в оригинале инструкции на стр. 9-10).*



#### **ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
е-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)