

НАБОР ИФА
ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И
ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К ОБЛИГАТНОМУ
ВНУТРИКЛЕТОЧНОМУ ПАЗАРИТУ
MYCOPLASMA PNEUMONIAE

EIA-3500, Mycoplasma pneumoniae IgM ELISA

Каталог. № : EIA-3500
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 08-2013
Версия 12.0



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

1 ВВЕДЕНИЕ

Иммуноферментный анализ для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM к облигатному внутриклеточному паразиту Mycoplasma pneumoniae в сыворотке человека.

2 ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Образцы пациента, разведенные раствором для разведения образцов инкубируются с IgG-РФ-сорбентом, содержащим гипериммунные анти-человеческие IgG-антитела, чтобы устранить конкурентное связывание со специфическими IgG, а также убрать ревматоидные факторы. Данная предварительная подготовка помогает избежать ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Микротитровальные стрипованные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигенами Микоплазмы. Разведенные образцы пациента и готовые к использованию контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфические к Микоплазме пневмонийной антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляются антитела IgM, конъюгированные пероксидазой хрена. Во время второй инкубации этот анти-IgM конъюгат связывается только с антителами IgM, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями.

После второй промывки (для удаления несвязанного конъюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции.

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgM специфичных к Микоплазме пневмонийной. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA-ридере.

Общее время инкубации: **1 час, 45 минут**

3 ПРИМЕЧАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Данный набор предназначен только для in-Vitro диагностики.
- Все компоненты человеческого происхождения, используемые для производства этих реагентов, были протестированы на антитела к HIV и HBsAg на методах 3-его поколения и показали отрицательный результат. Тем не менее, со всеми материалами необходимо обращаться как с потенциально инфицированными.
- Контроли и стандарты признаны не инфицирующими клеточные культуры.
- Избегать контакта со стоп-раствором, т.к. он содержит 0,5 Моль/л H₂SO₄. Может вызвать ожоги и раздражения кожи.
- Не пипетировать ртом. Избегать попадания реагентов и образцов на кожу и слизистые мембраны.
- В рабочих помещениях не курить, не есть, не пить, не наносить косметические средства.
- При работе с образцами и реагентами использовать одноразовые латексные перчатки. После работы тщательно мыть руки. Микробное загрязнение реагентов и образцов может привести к неправильному результату.

- Обращаться с реагентами набора в строгом соответствии с методами, определяемыми национальными нормами биологической безопасности.
- Не использовать реагенты после даты срока годности, указанной на этикетке набора.
- Все объемы реагентов, указанные в данной инструкции должны строго соблюдаться. Оптимальный результат можно получить только при использовании калиброванных мерных приборов и спектрофотометров.
- Не использовать вместе реагенты или стрипы из разных лотов, а также микрولунки разных наборов одного лота.
- Не использовать вместе реагенты разных производителей.
- Химикаты и приготовленные или использованные реагенты следует утилизировать как опасные отходы, в соответствии со стандартами биологической безопасности.
- Данные об опасных веществах, входящих в состав набора, указаны в Паспорте данных безопасности. Паспорт данных безопасности предоставляется по запросу напрямую от производителя (DRG Instruments GmbH).

4 КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Реагенты, поставляемые в наборе:

12	Микротитровальные стрипы 8-луночные (разламываемые) стрипы покрыты антигенами Микоплазмы; также в наборе 1 держатель, 1 покровная фольга
100 мл	Раствор для разведения образцов Готов к использованию, желтого цвета, pH 7,2±0,2
6,5 мл	IgG-РФ-Сорбент Готов к использованию, анти-человеческие IgG-антитела
1 мл	Положительный контроль , готов к использованию; желтого цвета, красный колпачок.
2 мл	Отрицательный контроль , готов к использованию; желтого цвета, желтый колпачок.
2 мл	Cut-off контроль , готов к использованию; желтого цвета, черный колпачок.
20 мл	Ферментный Конъюгат Готов к использованию, красного цвета Антитела к IgM человека, конъюгированные пероксидазой хрена
14 мл	Раствор ТМБ субстрата Готов к использованию, тетраметилбензидин
14 мл	Стоп-раствор Готов к использованию, H ₂ SO ₄ 0,2 моль/л
30 мл	Промывочный раствор 20x концентрат для 600 мл; pH 6,5±0,1

4.1.1 Оборудование и материалы, не входящие в состав набора

- Калиброванный спектрофотометр для микропланшетов (450/620нм ±10 нм)
- Калиброванные прецизионные микропипетки переменного объема
- Инкубатор, 37 °C
- Ручной или автоматический промыватель лунок
- Миксер для пробирок
- Деионизированная или свежая дистиллированная вода
- Таймер
- Впитывающая бумага

4.2 Стабильность и хранение

Реагенты стабильны до даты срока годности, указанной на этикетке при хранении при 2-8 °C. Не использовать реагенты после окончания срока годности!

Вскрытые реагенты хранить при температуре 2-8 °C. Микротитровальные лунки хранить при 2-8 °C в плотно закрытом пластиковом пакете.

Вскрытый набор стабилен до 2 месяцев при надлежащем хранении.

4.3 Подготовка реагентов

Все реагенты должны быть комнатной температуры!

Рабочий промывочный раствор

Развести промывочный раствор **1+19** (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий ридистиллированной водой. pH этого раствора 7,2±0,2.

Потребление: ~5 мл на определение

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °C на водяной бане.

Стабильность после разведения: 4 недели при 2 ÷ 8 °C

4.4 Утилизация набора

Утилизация набора должна производиться в соответствии с национальными правилами. Особая информация по данному продукту указана в Паспорте данных безопасности (см. главу 13 Паспорта).

4.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, следует немедленно уведомить поставщика в письменной форме, не позднее чем через неделю после получения набора. Поврежденные компоненты набора не следует использовать для анализа. Поврежденные компоненты необходимо сохранить до принятия окончательного решения. После этого поврежденные компоненты следует уничтожить в соответствии с официально установленными правилами.

5 ОБРАЗЦЫ

В этом анализе используется сыворотка.

Не использовать гемолизированную, желтушную, липемическую сыворотку.

Примечание: образцы, содержащие азид натрия, не должны использоваться в анализе.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Собрать кровь венепункцией, дать свернуться, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугировать до полного свертывания. Образцы пациентов, получающих антикоагулянтную терапию, могут потребовать более долгого времени свертывания.

5.2 Хранение образцов

Образцы закрыть крышками и хранить до 3 дней при 2-8 °С до анализа. Для более длительного хранения заморозить до -20 °С. Размороженные образцы инвертировать несколько раз перед тестированием.

5.3 Разведение образцов

Перед анализом каждый образец сначала должен быть разведен с Разбавителем для образцов. Для абсорбции РФ эти предварительно разведенные образцы должны быть инкубированы с *IgG-RF-Сорбентом*.

1. Развести каждый образец пациента **1+50** раствором для разведения образцов, напр., 10 мкл образца + 0,5 мл раствора для разведения (**хорошо смешать**).
2. Развести полученную смесь в **1+1** *IgG-РФ-Сорбентом*. Например, 60 мкл предварительно разведенного образца + 60 мкл *IgG-РФ-Сорбента*. **Тщательно перемешать**.
3. **Дать постоять минимум 15 минут при комнатной температуре или оставить на ночь при 2-8 °С и снова хорошо смешать**.
4. Взять 100 мкл полученной смеси для анализа.

Примечание: Контроли готовы к использованию и их не надо разводять!

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- **Очень важно довести все компоненты до комнатной температуры перед началом анализа!**
- После начала процедуры все этапы должны проводиться непрерывно.
- Во избежание перекрестного загрязнения реагентов использовать новые одноразовые наконечники для каждого реагента и образца.
- Абсорбция является функцией времени инкубации и температуры. Перед анализом рекомендуется приготовить все реагенты, удалив с них крышки, требуемое число лунок установить в держатель. Это обеспечит одинаковые промежутки между этапами пипетирования без перерывов.
- Как правило, ферментативная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.
- Плотно закрывать крышки флаконов с реагентами сразу после использования во избежание испарения и микробного загрязнения.
- После хранения ранее вскрытых реагентов проверить конъюгат и контроли на микробное загрязнение перед дальнейшим использованием.
- Во избежание перекрестного загрязнения и завышенных результатов необходимо аккуратно пипетировать образцы пациентов и вносить конъюгат без распыливания, на дно лунки.
- Во время инкубации накрывать микротитровальные лунки пленкой, чтобы не допустить испарения.

6.2 Процедура Анализа

Перед проведением анализа необходимо составить схему распределения и идентификации образцов и контролей с помощью формы, вложенной в набор.

1. Отобрать требуемое количество микротитровальных стрипов или лунок и поместить их в держатель.
Разместите, по меньшей мере:
1 лунка (напр. А1) для бланка субстрата
1 лунка (напр. В1) для отрицательного контроля
2 лунки (напр. С1+D1) для cut-off контроля
1 лунка (напр. Е1) для положительного контроля
На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.
2. Добавить
100 мкл отрицательного контроля в лунку В1
100 мкл cut-off контроля в лунки С1+ D1
100 мкл положительного контроля в лунку Е1 и
100 мкл каждого разведенного образца пациента с новым одноразовым наконечником в оставшиеся лунки согласно схеме распределения
Зарезервируйте лунку **А1 для бланк субстрата!**
3. Накрывать лунки пленкой, поставляемой в наборе. Инкубировать **1 час при 37 °С**.
4. Удалить вакуумом содержимое лунок и промыть их 5 раз 300 мкл рабочего промывочного раствора. В конце осторожно удалить остатки жидкости, выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!
Примечание:
Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.
5. Раскапать **100 мкл Конъюгата** во все лунки кроме **А1** и накрыть их фольгой.
6. Инкубировать **30 минут при комнатной температуре (от 20 до 25 °С)**. Не подвергать воздействию прямого солнечного света!
7. Повторить промывку как в п.4.
8. Раскапать по **100 мкл** готового к употреблению раствора ТМБ во все лунки и опять их накрыть.
9. Инкубировать **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ± 25 °С) в темноте**.
10. **Раскапать по 100 мкл** стоп-раствора (как и ТМБ) **во все** лунки.
Примечание: высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!
11. Считать оптическую плотность при 450/620 нм на ридере в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.

6.3 Измерение

Настроить микропланшетный ридер для ELISA на нуль, используя **бланк субстрата в лунке А1**.

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на нуль используя бланк субстрат в лунке А1, вычитайте значение абсорбции лунки А1 из всех остальных значений абсорбции. Измерить абсорбцию во всех лунках при 450 нм и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в схему.

Двойная длина волны – рекомендуется считывать на 620 нм как референтной длине волны. Где применимо рассчитать среднее значение абсорбции всех дублей.

7 РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Оценка надежности результатов

Постановка анализа может считаться **действительной** при соблюдении следующих условий:

- бланк субстрата (**А1**): ⇒ значение абсорбции ниже **0,100**.
- отриц. контроль (**В1**): ⇒ значение абсорбции ниже **0,300**.
- cut-off контроль (СО) в С1/D1 ⇒ значение абсорбции между **0,350 – 0,850**
- полож. контроль (**D1**) ⇒ значение абсорбции между **0,650 – 3,000**

7.2 Расчет

Среднее значение абсорбции cut-off контроля (СО)

Рассчитать среднее значение абсорбции для 2 определенных cut-off контролей (напр., С1/D1)

Пример: (0,49+0,51) ÷ 2 = 0,50 = СО

7.3 Интерпретация

средние значения абсорбции пациента **более чем на 10% выше СО**
⇒ **положительный результат**

средние значения абсорбции пациента **до 10% выше или до 10% ниже СО**
⇒ **серая зона**

⇒ повторить анализ
через 2-4 недели на новых образцах

средние значения абсорбции пациента
более чем на 10% ниже СО
⇒ отрицательный результат

7.3.1 РЕЗУЛЬТАТЫ В ЕДИНИЦАХ ДРГ [DU]

$$\frac{\text{Среднее значение абсорбции} \times 10}{\text{СО}} = [\text{единицы DRG} = \text{DU}]$$

Пример $\frac{1,580 \times 10}{0,490} = 32 \text{ DU (единицы DRG)}$

Интерпретация результатов

Cut-off значение:	10	DU
Серая зона:	9 - 11	DU
Отрицательно:	< 9	DU
Положительно:	> 11	DU

8 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с региональными и государственными нормами. Использование контрольных образцов необходимо для подтверждения достоверности рутинных тестов. Использовать контроли при нормальных и патологических уровнях.

Так же рекомендуется использовать отечественные и международные программы оценки качества, для того чтобы обеспечить точность результатов.

Если результат анализа не соответствует установленным допустимым диапазонам контрольных материалов, результат пациента считается недействительным.

В этом случае необходимо проверить следующие технические моменты: дозирующие устройства, таймеры, даты срока годности реагентов, условия инкубации и хранения, методы аспирации и промывки.

После проверки вышеуказанных пунктов и не обнаружении ошибок в процедуре необходимо связаться с вашим поставщиком продукции ДРГ.

9 ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Диагностическая специфичность - 100%

9.2 Диагностическая чувствительность – 89%

10 ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Бактериальное загрязнение или многократное замораживание/оттаивание образцов могут повлиять на значения абсорбции. Результаты пациентов с ослабленным иммунитетом, а так же новорожденных имеют ограниченное диагностическое значение.

11 ЮРИДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Анализ должен выполняться в строгом соответствии с вложенной в набор инструкцией. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правил Надлежащей лабораторной практики или прочих национальных стандартов и/или законов. Это особенно важно для использования контрольных реагентов. Наряду с образцами пациента важно включать в каждую постановку достаточное количество образцов для подтверждения диагностической достоверности и сходимости анализа.

Результаты анализа действительны только в том случае, когда все контроли находятся в пределах указанных допустимых диапазонов, и все другие параметры анализа также соответствуют указанным спецификациям тест-системы.

11.2 Терапевтические последствия

Терапевтические последствия не должны основываться только на результатах лабораторных тестов. Любой результат лабораторного анализа является только частью клинической картины пациента.

Диагностика инфекции не должна основываться на результате одного теста. Точный диагноз должен учитывать историю болезни, симптоматику и серологические данные.

Выводы о лечении могут приниматься только в случае соответствия результатов лабораторного анализа клинической картине пациента.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора или замена/одновременное использование компонентов разных лотов одного наименования может привести к ошибочному результату. Такое изменение / замена делают претензию недействительной.

Рекламации, связанные с неправильной интерпретацией пользователем результатов анализа так же недействительны. Вне зависимости от причины рекламации, ответственность производителя не превышает стоимость набора. Производитель не несет ответственность за любые повреждения, возникшие при транспортировке набора.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com