



**Набор ИФА
для полуколичественного и качественного
определения в сыворотке и плазме антител
класса IgG к *M.pneumoniae***

Каталог. № : TXG3034G

Количество : 96

Производитель: Orgenium Laboratories (Финляндия)

Методика от 18-02-2009

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

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор компании «Орджениум Лабораториз» *Mycoplasma pneumoniae* (M.pneumoniae) IgG Antibody EIA Test разработан для полуколичественного и качественного определения специфических антител класса IgG в сыворотке и плазме к *M.pneumoniae*.

Настоящий анализ предназначен только для диагностического использования in vitro.

Окончательный диагноз должен быть поставлен квалифицированным врачом в контексте клинической истории пациента в сочетании с другими подтверждающими диагностическими методами при их применении.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящее исследование основано на принципе иммуноферментных анализов (ИФА). Очищенный антиген наносится на поверхность лунок микротитрационного планшета. Разбавленные образцы и контроли капают из пипетки в лунки микротитрационного планшета. Происходит закрепление между антителами класса IgG сыворотки или плазмы и иммобилизованным антигеном. После 30-минутной инкубации при 37°C планшет промывается разбавленным промывочным раствором, чтобы удалить несвязанный материал. Впоследствии, конъюгат пероксидазы анти-человеческого IgG добавляется и инкубируется в течение 30 минут при 37°C. После дальнейшей промывки раствора (ТМБ) субстрата капается из пипетки и инкубируется в течение 15 минут при 37°C, стимулируя развитие синего цвета в лунках. Развитие цвета прекращается добавлением стоп-раствора, который изменяет цвет от синего до желтого. Получившийся окрас измеряется спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Общее время инкубации: **75 минут**.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

1. **Микролуночный планшет**, 1 шт. : 12x8 лунок

Микротитрационные стрипы, помеченные определенным цветом и кодом, каждая состоящая из 8 лунок, покрытых очищенным антигеном *M.pneumoniae*.

Цветовые и текстовые коды указывают исследуемый на стрипе патоген.

2. **Отрицательный контроль**, 1 флакон

Готовый к использованию.

3. **Положительный контроль**, 1 флакон

Готовый к использованию.

4. **Ферментный конъюгат****, 15 мл

Антитела к человеческому IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена, синего цвета. Готовый к использованию.

5. **Раствор субстрата ТМБ**, 8 мл

Содержит раствор 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Готовый к использованию; потенциально опасен при контакте с кожей; раздражает глаза.

6. **Стоп-раствор ТМБ**, 8 мл

Содержит раствор 2 N серной кислоты (H₂SO₄)

Готовый к использованию; избегать контакта со стоп-раствором; он может вызвать раздражения кожи и ожоги.

7. **Разбавитель образцов*****, 120 мл

Готовый к использованию.

8. **Промывочный буфер – концентрат**, 50 мл 20x концентрированный

9. **Крышка планшета**, 1 шт.

Крышка для накрывания микротитрационных стрипов во время инкубации.

СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Все компоненты набора, кроме 20x концентрированного промывочного буфера, должны храниться при 2-8°C и использоваться до даты истечения срока годности, указанного на этикетке. Хранить 20x концентрированный промывочный буфер при комнатной температуре.
- В случае образования кристаллов в буфере, просто следует нагревать реактивную бутылку до 37°C, пока кристаллы полностью не растворятся.
- Неиспользованные стрипы должны быть помещены в мешочек, содержащий осушитель и плотно закрыты перед хранением при 2-8°C. После вскрытия стрипы стабильны пока осушитель не станет розовым.
- Разбавленный промывочный раствор может храниться в течение 1 недели при комнатной температуре или 1 месяц при 2-8°C.
- Готовый к использованию фермент, конъюгированный анти-человеческими антителами, сразу после вскрытия стабилен до окончания срока годности на этикетке. Предотвращать от загрязнения. Не возвращать неиспользованную часть конъюгированного ферментом раствор анти-человеческого IgG обратно в бутылку с исходным раствором.
- Все другие жидкие реагенты стабильны если хранить при 2-8°C, при условии, что с ними обращаются внимательно во избежание любого загрязнения окружающей среды. Прежде, чем их выбросить или обработать в автоклаве, они должны рассматриваться как потенциально инфекционные.

ОБЩИЕ РЕАГЕНТЫ

Следующие реагенты могут взаимозаменяться между разными наборами серии наборов «Клиникит» компании «Орджениум»:

- Промывочный буфер
- Стоп-раствор
- Субстратный раствор

Следующие компоненты могут взаимозаменяться между другими IgG-наборами серии наборов «Клиникит» компании «Орджениум»:

- Ферментный конъюгат
- Отрицательный контроль
- Разбавитель образца

Следующие компоненты могут использоваться с другими сериями наборов *M.pneumoniae* IgG компании «Орджениум»:

- Положительный контроль

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Должны использоваться образцы сыворотки или плазмы (ЭДТА, гепарин); соблюдать обычные предосторожности при венопункции. Образец может храниться при 2-8°C до 48 часов, но должен быть заморожен до -20°C или ниже в течение более длительного хранения.
- Необходимо избегать повторного замораживания/размораживания.
- Размороженные образцы должны быть перевернуты несколько раз перед исследованием.
- Не использовать чрезвычайно гемолизированные или липемические образцы.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ МАТЕРИАЛЫ:

- Таймер
- Вихревой смеситель (вортекс)
- Пробирки для разбавления образцов на 2 или 4 мл
- Дозаторы (3, 20, 50, 100, 500 мкл и 1 мл) и многоканальный дозатор (400 мкл)
- Одноразовые наконечники
- Инкубатор, способный к поддержанию 37±2°C
- Дистиллированная вода
- Мерные колбы для подготовки промывочного раствора
- Магнитная мешалка и дополнительная стойка для подготовки промывочного буфера
- Резервуары реагентов для многоканальных дозаторов
- Бумажные полотенца или промокательная бумага
- Микротитрационный ИФА-ридер, способный измерять абсорбцию при 450 нм
- Микротитрационный планшет-вошер (выборочно).

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

Всем реагентам, образцам и контролям нужно позволить достичь комнатной температуры перед использованием.

1. Образцы сыворотки и плазмы

Перемешать вихревым смесителем и разбавить образцы сыворотки 1:101 готовым к использованию разбавителем сыворотки (например, 10 мкл образца + 1 мл разбавителя образца).

10 мкл сыворотки + 1 мл разбавителя образца

2. Промывочный буфер

Хорошо перемешать и разбавить концентрат промывочного буфера дистиллированной водой 1:20 (например, 50 мл концентрата + 950 мл дистиллированной воды). Если во время хранения в холодном месте образуется осадок кристаллов, концентрат нужно нагревать до 37°C в течение 15 минут. Проверить pH разбавленного промывочного буфера и если необходимо сбалансировать его pH на уровне 7.4. Промывочный буфер стабилен 1 месяц при 2-8°C или в течение 1 недели при комнатной температуре.

50 мл концентрата промывочного буфера + 950 мл дист. воды

ВАЖНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- По крайней мере за 1 час до использования привести все реагенты, набор калибраторов и образцы к комнатной температуре (18-30°C), тщательно их перемешивая вихревым смесителем.
- Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно государственным нормам. Рекомендуется использование контрольных сывороток или плазмы, чтобы обеспечить проверку правильности относительно результатов. Использовать контроли и на нормальных и патологических уровнях.
- Периоды распределения и инкубации должны быть одинаковыми для всех лунок в том же анализе. При ручном проведении анализа использовать многоканальный дозатор.
- Как только анализ начат, все этапы должны быть завершены без прерывания. Используйте новые одноразовые пластмассовые наконечники дозатора для каждого реагента.
- Не позволяйте реакционным лункам высыхать в течение процедуры анализа. Это может вызвать высокие фоновые помехи в лунках бланка и ошибочные результаты.
- Если Вы не готовы к следующему этапу, или если процедура анализа неожиданно прервана, просто оставьте лунки в промывочном буфере. Однако, не более чем на 5 минут.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Подготовить образцы и разбавленный промывочный буфер** как описано выше.

2. **Определить требуемое количество** 8-луночных стрипов. Настоятельно рекомендуется анализировать каждый образец и контроль в дубле.

Рекомендуемое размещение контролей:

- 2 лунки (например, А1 и В1): для бланка субстрата (100 мкл разбавителя образца)
 - 2 лунки (например, А2 и В2): для отрицательного контроля (100 мкл)
 - 2 лунки (например, А3 и В3): для положительного контроля (100 мкл)
- Остальные лунки используются для образцов пациентов.

3. Закрепить в штативе желаемое количество микротитрационных стрипов и накрыть пленкой для планшета (поставляемой). Возвратить остальные стрипы в мешочек и хранить при 2-8°C.

4. **Раскапать по 100 мкл разбавителя образца, контролей и разбавленных образцов** в соответствующие лунки стрипов.

5. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **30 минут при 37°C**.

6. **Промывка:** Процедура промывки крайне важна и должна проводиться с осторожностью. Неправильная промывка может вызвать неточные результаты, такие как низкая точность и высокий фон. Промывать планшет вручную или используя автоматический планшет-вошер.

При ручной промывке энергично встряхнуть жидкость, и добавить 300 мкл разбавленного промывочного буфера. Освободить лунки, встряхнув жидкость, чтобы удалить любые ее остатки. Повторить эту процедуру, чтобы в общем количестве составило 4 промывки. По завершении последней промывки перевернуть планшет и постучать о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки и прерывания.

При автоматической промывке произвести аспирацию всех лунок и промыть 4 раза **300 мкл разбавленного промывочного буфера**. Опорожнить лунки, встряхнув жидкость, для удаления ее остатков.

Повторить эту процедуру, что в общем количестве получилось **4 промывки**. После конечной промывки перевернуть планшет и постучать ним о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки или прерывания.

При автоматический промывке произведите аспирацию всех лунок и промойте **4 раза 300 мкл разбавленного промывочного буфера**. Постучать планшетом о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки и прерывания.

7. Добавить последовательно по **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку.

8. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **30 минут при 37°C**.

9. **Промывка:** Промыть планшет следуя процедуре в этапе 6.

10. **Быстро раскапать по 50 мкл** раствора ТМБ в промытые лунки.

11. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **15 минут при 37°C**.

12. Остановить реакцию, добавив 25 мкл стоп-раствора ТМБ в каждую лунку. Осторожно встряхнуть и считать при 450 нм в пределах **20 минут** с момента добавления стоп-раствора.

СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

| Разбавленный образец 100 мкл | Ферментный конъюгат 100 мкл | Субстрат ТМБ 50 мкл | Стоп-раствор ТМБ 25 мкл |
|---------------------------------|--------------------------------|------------------------|----------------------------|
| 30 мин. Инкубации при 37°C. | 30 мин. | 15 мин. | Считать планшет |

ЗНАЧЕНИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Перед началом расчета результатов убедитесь, что полученные значения для реагента бланка и контролей находятся в пределах предоставленных в Таблице 1 значений.

Таблица 1: Значения контроля качества

| Образец | Ожидаемый результат |
|------------------------|--|
| Бланк-реагент | Значение абсорбции < 0.150 |
| Отрицательный контроль | Значение абсорбции < 0,200 *(Отриц. с соотнош. s/co < 0,8 |
| Положительный контроль | Положительный (соотнош. s/co ≥ 1) |

*s/co – абсорбция образца/пороговое значение

Результаты считаются достоверными только если значение абсорбции бланка не превышает 0,150 и значение средней абсорбции отрицательного контроля не превышает 0,200.

РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**1. Расчет ОП порогового значения (cut-off):**

$$\text{ОП Cut-off} = \text{константа Cut-off} \times (\text{ОП полож. константы} - \text{ОП отриц. константы})^*$$

Показатель константы порогового значения см. в Сертификате контроля качества, сопровождающий этот набор. Для точной интерпретации результатов обязательно использовать правильный показатель константы порогового значения.

2. Расчет соотношения s/co:

$$S/CO = \frac{\text{значение ОП образца}^* - \text{ОП отрицательного контроля}}{\text{ОП порогового значения}}$$

*Настоятельно рекомендуется анализировать каждый контроль в дубле. Просьба использовать средние значения абсорбции каждого контроля/образца исходя их формул выше.

3. Схема интерпретации результатов соотношения s/co:

| Соотношение s/co | Интерпретация |
|------------------|---------------|
| <0,80 | Отрицательный |
| 0,80-0,99 | Сомнительный |
| >1 | Положительный |

4. Диагностическая достоверность результатов

Таблица 2: Диагностическая достоверность и интерпретация результатов.

| | Результаты IgG | Результаты IgM | Результаты IgA | Интерпретация |
|--------------|----------------|----------------|----------------|---|
| M.pn. | Отрицательный | Отрицательный | Отрицательный | Антител не обнаружено |
| | Положительный | Отрицательный | Отрицательный | Прошедш. инф-я. Высокий уровень IgG - признак острой инфекции |
| | Отрицательный | Положительный | Положительный | Признак острой инфекции |
| | Положительный | Отрицательный | Положительный | Признак повторной инфекции |

5. Полуколичественный расчет результатов анализа

Вы можете перевести значение ОП Вашего образца в ИФАЕ (иммуноферментные единицы) следующим образом:

ИФАЕ = S/CO x 25

6. Интерпретация образцов острой фазы болезни и на этапе выздоровления

Для определения сероконверсии необходимо сравнить значения ОП парных образцов и рассчитать следующее:

% изменения = $\frac{\text{значение ОП 2го образца} - \text{значение ОП 1го образца} \times 100}{\text{Значение ОП 1го образца}}$

7. Схема интерпретации сероконверсионных результатов

| % изменения в значении ОП | Интерпретация |
|---------------------------|--|
| < 50% | Отсутствие сероконверсии. Отсутствие очевидности недавней инфекции. Рекомендуется сделать забор третьего образца и анализировать параллельно с первым образцом, чтобы наблюдать за значительным увеличением показателя ОП. |
| ≥ 50% | Сероконверсия. В показателе ОП обнаруживается значительное увеличение. Серологический признак острой инфекции (реактивация, повторная инфекция или первичная инфекция, где образец острой фазы был собран слишком поздно, чтобы продемонстрировать сероконверсию). |

Значительное (т.е. ≥ 50%) увеличение абсорбции (ОП) в ИФА при 450 нм в парных сыворотках, собранных в промежутке 8-15 дней указывает на острую инфекцию.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

| Образец | Средняя абсорбция при 450 нм |
|------------------------|------------------------------|
| Реагент бланка | 0,050 |
| Положительный контроль | 1,378 |
| Отрицательный контроль | 0,068 |
| Сыворотка образца | 0,678 |

Пороговое значение ОП = 0,220 (1,378-0,068) = 0,228
(Примечание: показатель константы порогового значения, указанный выше 0,220 является только примером. Правильное значение для настоящего набора см. в Сертификате контроля качества).
S/CO = 0,678 - 0.068 / 0,228 = 2,7
 Значение **ИФАЕ** образца : 2,7 x 25 = 67 ИФАЕ
Результат образца: положительный
Значение ИФАЕ образца: 67 ИФАЕ

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Всего 83 образца пациентов исследовались параллельно настоящим набором и имеющимся в продаже аналогичным набором в отделе исследований университетской больницы г. Базель, Швейцария. Результаты вариаций в анализе, между анализами и между сериями отрицательных, низко положительных и положительных образцов представлено в таблице ниже:

| ИФА M.pneumoniae | IgG |
|-----------------------------------|--|
| Точность в анализе | 4 - 9 % |
| Точность между анализами | 5 – 12 % |
| Точность между сериями | 4 - 10 % |
| Перекрестная реактивность | Отсутствие перекрестной реактивности к гриппу А, РСВ и ЦМВ |
| Интерференции | Отсутствует относительно билирубина в концентрации до 0,3 мг/мл, гемоглобина до 8,0 мг/мл и триглицеридов до 5,0 мг/мл |
| *Серологическая специфичность | 95,4 % |
| * Серологическая чувствительность | 90,6 % |
| * Серологическая точность | 91 % |

*Сравнение с другим имеющимся в продаже набором ИФА M.pneumoniae IgG.

ВНИМАНИЕ

- Отрицательный результат не исключает текущей или недавней инфекции. Если есть подозрение на острую инфекцию, второй образец сыворотки, полученный 7-14 днями позже, должен быть проверен параллельно, чтобы определить любое увеличение уровня антитела.
- Серологические результаты иммунодепрессивных пациентов должны интерпретироваться с предостережением.
- Результаты исследований, которые получены от единственного серологического образца, не должны использоваться для диагностики недавней инфекции. Соединенные образцы (острый и выздоравливающий) должны исследоваться параллельно, чтобы наблюдать за значительным повышением уровня антител.
- Если требуются сравнения с другими методами, всегда проводят оба исследования одновременно, чтобы предотвратить неожиданные результаты.
- Результаты исследований должны быть оценены в сочетании с информацией, предоставленной клиническим обследованием и другими диагностическими процедурами.
- На эффективность работы компонентов набора не влияет транспортировка при температуре окружающей среды до 5 дней (неофициальные данные).

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Настоящий набор предназначен только для диагностического использования in vitro в человеческой сыворотке или плазме квалифицированным и компетентным персоналом, выполняющим диагностические процедуры. Если получатель настоящего набора передает его любым способом третьему лицу, эта инструкция, должна прилагаться, и вышеуказанный получатель должен под собственную ответственность обеспечить в пользу производителя все ограничения ответственности здесь изложенные. Компания-производитель не несет ответственности за любые повреждения или потери из-за использования набора в любых случаях кроме тех, которые четко указаны в этой инструкции. Ответственность производителя ни в коем случае не должна превышать коммерческой ценности набора. Производитель ни в коем случае не несет ответственности за косвенные, умышленные или наследственные повреждения, включая, но не ограничиваясь потерей прибыли.

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