

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К MYCOPLASMA PNEUMONIAE

EIA-3499, Mycoplasma pneumoniae IgG ELISA

Каталог. № : EIA-3499
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 04-2012
Версия 9.0



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

Только для использования в *in vitro* диагностике

1. ВВЕДЕНИЕ

Данный набор предоставляет материалы для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к МИКОПЛАЗМЫ ПНЕВМОНИИ в сыворотке.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

DRG MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgG ELISA – это иммуноферментный набор со стрипами микротитра для определения антител класса IgG к антигену Mycoplasma pneumoniae в сыворотке человека. Ячейки со стрипами микротитра в качестве твердой фазы покрыты антигенами Mycoplasma pneumoniae. Разведённые образцы сыворотки и готовые к использованию контрольные образцы пипетируются в ячейки. Во время первой инкубации комплекс антиген Mycoplasma pneumoniae – специфическое антитело, образец с положительным результатом и контрольный образец связываются с иммобилизованными антигенами. После промывки для удаления несвязавшихся образцов и контрольного материала в ячейки добавляется конъюгат пероксидазы хрена и антител к IgG. Во время второй инкубации этот анти-IgG конъюгат специфически связывается с IgG антителами, приводя к образованию энзим-связанного иммунного комплекса. После второй промывки для удаления несвязавшегося конъюгата сформировавшиеся иммунокомплексы (в случае положительного результата) обнаруживаются инкубацией в веществе ТМБ и появлением синего окрашивания. Синее окрашивание меняется на желтое в результате остановки реакции ферментного индикатора с серной кислотой. Интенсивность этого окрашивания прямо пропорциональна количеству комплекса Mycoplasma pneumoniae - IgG в образце пациента. Поглощение при 450 нм считывается при помощи микротитровального ридера ELISA.

3. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- Набор предназначен только для использования в *in vitro* диагностике.
- Все компоненты человеческого происхождения, используемые для производства этих реагентов, предварительно протестированные и показавшие отсутствие реакции на поверхностные антигены гепатита В, а так же на антитела ВИЧ при взаимодействии с реагентами разрешенными FDA.
- Тем не менее со всеми материалами необходимо обращаться как с потенциально инфицирующими.
- Контроли и стандарты образец признаны неинфицирующими в культуре клеток.
- Не пипетировать ртом. Не курить, не есть, не пить в рабочих помещениях.
- Не смешивать компоненты из разных лотов.
- Не использовать по истечении срока годности, указанного на этикетке.
- Не смешивать и не использовать компоненты из разных наборов и разных партий. Рекомендуется не заменять лунки из разных планшетов, даже из аналогичной партии.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки:** лунки покрытые антигеном Mycoplasma pneumoniae (12x8 лунок).
2. **Раствор для разведения образцов*:** Желтого цвета: 1 флакон (100 мл), pH 7,2 +/- 0,2.
3. **Положительный контроль*:** Желтого цвета. Красный колпачок: 1 флакон (1 мл).

4. **Отрицательный контроль*:** Желтого цвета. Желтый колпачок: 1 флакон (2 мл).
 5. **Cut-off контроль*:** (готов к использованию): Желтого цвета. Черный колпачок: 1 флакон (2 мл).
 6. **Ферментный конъюгат*:** Красного цвета: 1 флакон (20 мл).
 7. **ТМБ – раствор субстрата** (готов к использованию): 1 флакон (14 мл).
 8. **Стоп-раствор:** 0,2 моль/л H₂SO₄: 1 флакон (14 мл).
 9. **Промывочный раствор** (20x концентрат для 600 мл, pH 7,2 +/- 0,2): 1 флакон (30 мл). См. «Приготовление реагентов».
- *⇒ содержит 0.03 % ProCin 300

4.1.1 Необходимые, но не поставляемые материалы

- Микропланшетный ридер с фильтром 450/620 +/-10 нм.
- Калибровочные микропипетки.
- Инкубатор 37°C.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Вихревой миксер.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер.
- Абсорбирующая бумага.

4.2 Хранение и стабильность набора

При температуре хранения от 2 до 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты использовать не рекомендуется.

После восстановления любой раствор стандарта может храниться при 2 – 8 °C в течение 8 дней. При -20°C раствор может храниться значительно дольше.

Конъюгат, субстрат, промывочный буфер и нулевой стандарт должны храниться при 2 – 8°C

Микропланшета должна храниться при 2 – 8°C. После вскрытия фольгированного пакета при хранении пакет необходимо держать плотно закрытым. Иммуноактивность лунок сохраняется приблизительно в течение 6 недель при хранении во вскрытом, но плотно закрытом пакете с влагопоглотителем.

4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием необходимо довести все реагенты и необходимое количество стрипов до комнатной температуры.

Промывочный раствор

Развести промывочный раствор **1+19** (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистиллированной водой. 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

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с официальными государственными правилами. Вся необходимая информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в оригинале инструкции).

4.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Не рекомендуется тестировать поврежденные наборы.

5. ОБРАЗЦЫ

В данном анализе может использоваться сыворотка.

Не использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь стандартным методом венепункции, дать свернуться и отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре.

5.2 Хранение образцов

Образцы должны быть закрытыми, их необходимо хранить до 24 часов при температуре 2-8°C до начала анализа и должны быть заморожены только раз до -20°C для хранения в течении более длительного периода. Размороженные образцы необходимо несколько раз перевернуть перед анализом.

5.3 Разведение образцов

Развести каждый образец пациента **1+100** раствором для разведения образцов, напр., 10 мкл образца + 1 мл раствора для разведения (хорошо смешать, инкубировать в течение 15 минут, хорошо смешать).

Внимание: Контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие примечания

Внимательно прочитайте инструкцию перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от четкого следования инструкциям.

- **Перед использованием все реагенты довести до комнатной температуры.** Реагенты необходимо смешать без образования пены.

- Рекомендуется проводить процедуру непрерывно.

- Избегать контаминации реагентов, пипеток, и лунок/пробирок. Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для каждого реагента или образца.

- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, извлечь крышки, установить лунки в держатель и т.д. Это обеспечит непрерывное проведение каждого этапа пипетирования.

- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Перед проведением анализа необходимо разбавить промывочный раствор, **приготовить образцы пациентов как описано в п. 5.3**. Перед пипетированием хорошо перемешайте и составьте **схему распределения и идентификации** 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., A1) для бланка субстрата
- 1 лунка (напр., B1) для отрицательного контроля
- 2 лунки (напр., C1+D1) для Cut-off контроля и
- 1 лунка (напр., E1) для положительного контроля.

На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.

2. Раскапать:

- 100 мкл отрицательного контроля в лунку B1
- 100 мкл Cut-off контроля в лунки C1 и D1
- 100 мкл положительного контроля в лунку E1 и

100 мкл **каждого разведенного** образца пациента с **новыми одноразовыми наконечниками** в оставшиеся лунки согласно схеме. Оставить лунку A1 для бланка субстрата!

3. Накрыть лунки пленкой поставляемой в наборе. Инкубировать: **1 час при 37 °C**.

4. Резко встряхните содержимое лунок. Промойте их **5 раз 300 мкл/лунку** 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** ферментного конъюгата во все лунки **кроме A1** и накрыть их пленкой.

6. Накрыть лунки пленкой. Инкубировать: **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °C)**. Не подвергать воздействию прямого солнечного света!

7. Повторить процедуру промывки как описано в этапе 4. **Примечание: осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку!**

8. Раскапать **100 мкл** раствора субстрата **во все** лунки

9. Накрыть и инкубировать: **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ± 25 °C) в темноте**.

10. Остановить ферментную реакцию путем внесения **100 мкл** стоп-раствора **в каждую** лунку. Любое голубое окрашивание проявившееся во время инкубации переходит в желтое.

Примечание: высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!

11. Считать оптическую плотность при **450/620 нм** с помощью микротитрационного планшетного ридера в течении **30 минут** после внесения стоп-раствора.

6.3 Измерение

Настроить микропланшетный ридер для ELISA на нуль используя **бланк субстрата в лунке A1**.

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на нуль используя бланк субстрат в лунке A1, вычитайте значение абсорбции лунки A1 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 считать на 620 нм как референтной длине волны. Где применимо рассчитать среднее значение абсорбции всех дублей.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Надежность процесса анализа

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

- **Бланк субстрата в A1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.100**.
- **Отриц. контроль в B1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.200**.
- **Cut-off контроль в C1/D1:** ⇒ значение абсорбции между **0.300 - 0.800**.
- **Полож. контроль в E1:** ⇒ значение абсорбции более **0.600**.

7.2 Вычисление

Значение средней абсорбции Cut-off контроля (CO). Вычислите значение средней абсорбции двух (2) определенных cut-off контролей (напр: в C1/D1).

Пример: $(0,49 + 0,51) : 2 = 0,50 = CO$

7.3 Интерпретация

Средние значения абсорбции образцов пациента более чем на **10 % выше CO**
⇒ **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

(Средние) значения абсорбции пациентов **от 10 % выше до 10 % ниже CO**
⇒ **серая зона** ⇒ **повторить анализ**

2 - 4 недели спустя – на новых пробах пациентов

результат второго анализа опять в «серой зоне»
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

средние значения абсорбции пациента более чем 10% ниже CO
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

7.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

среднее значение абсорбции пациента x 10
————— = [ЕДИНИЦЫ ДРГ = ДЕ]
CO

1.580 x 10

Пример: ————— = 32 ДЕ
0.50

Интерпретация результатов

Значение Cut-off: 10 ДЕ

Серая зона: 9 – 11 ДЕ

Отрицательный: < 9 ДЕ

Положительный: > 11 ДЕ

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с нормами федеральных и государственных прав. Использование контрольных образцов обеспечивает достоверность результатов анализа. Используйте контроли на нормальном и патологическом уровнях.

Так же рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для обеспечения точных результатов анализа.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и отклонений. Если результаты анализа не соответствуют установленным допустимым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента необходимо рассматривать как недействительные. В этом случае, проверьте следующие технические данные: приборы для пипетирования, фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирационные и промывочные методы.

В случае проверки всех выше перечисленных пунктов вы не обнаружили никаких неисправностей, обратитесь к вашему дистрибьютору или же непосредственно в компанию DRG.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяется как вероятность получения негативного результата при отсутствии специфического анализа.

Она составляет 100 %.

9.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется как вероятность получения позитивного результата при присутствии специфического анализа.

Она составляет 93%.

9.3 Точность

9.3.1 Точность внутри анализа была определена 20-кратным измерением 3 положительных образцов.

Образец	Среднее OD	CV (%)	n
1	1.84	7.17	20
2	1.49	6.97	20
3	1.06	3.76	16

9.3.2 Вариация между анализами определялась с использованием cut-off контроля, положительного контроля и 3 образцов из 2 наборов в 10 анализах в 2 дублях.

Образец	Среднее OD	CV (%)	n
1	1.69	2.73	10
2	0.87	6.55	10
3	1.28	3.42	10

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Бактериологическое заражение или повторные циклы замораживания/размораживания образцов может повлиять на значения абсорбции. Только в иммунокомпромиссных пациентов и новорожденных серологические данные имеют ограниченные значения.

10.1 Интерферирующие субстанции

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0.5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

11. ЮРИДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться согласно инструкции производителя. Более того, потребитель должен точно соблюдать все правила профессиональной лабораторной практики или другие соответствующие национальные стандарты и/или законы. Это особенно относится к контрольным реагентам. В процессе проведения анализа важно включать достаточное количество контролей для оценки точности теста. Результаты теста действительны, только если они отвечают нормам и если все параметры теста отвечают спецификации теста. В случае любого сомнения свяжитесь с производителем.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения не должны базироваться только на результатах лабораторных исследований, даже если они считаются достоверными согласно п. 11.1. Любой результат является только частью общей клинической картины пациента.

Диагностика инфекционного заболевания не может устанавливаться только на основе единственного результата анализа. Точная диагностика должна учитывать всю клиническую картину пациента (историю, симптомы, сывороточные данные). Только в случаях, когда лабораторные результаты совпадают с нормами и общей картиной пациента, можно делать терапевтическое заключение.

Только результаты этого теста не могут быть основой для терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и/или замена или компонентов разных лотов с одного набора или с другого может негативно влиять на результаты и весь тест. Такая замена не может быть основой для претензий или просьбы о замене набора.

Претензии в случаях неправильного использования набора лабораторией, исходя из п. 11.2, тоже не могут являться действительными. Не смотря на это, в случае любой претензии, производитель обязывается не повышать значения набора. Производитель не несет ответственности за любое повреждение набора, случившееся вследствие его неправильной транспортировки.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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