

НАБІР РЕАГЕНТІВ

МІКОПЛАЗМА PNEUMONIAE IgG ELISA

Mycoplasma pneumoniae IgG ELISA

Каталог. №: EIA-3499

Дата випуску інструкції: 2016/07
Версія 11.0



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

1 ВСТУП

1.1 Призначення

Даний набір являє собою імуноферментний аналіз для **якісного** та **напівкількісного** визначення антитіл класу IgG до Мікоплазми пневмонії в сироватці або плазмі людини.

Цей тест призначений тільки для діагностики в лабораторних умовах.

2 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Даний набір являє собою твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA). Мікротитрові лунки як тверда фаза покриті антигенами Мікоплазми пневмонії.

Розведені зразки пацієнта і готові до використання контролю піпетуються в ці лунки. Під час інкубації специфічні антитіла Мікоплазми пневмонії позитивних зразків і контролів зв'язуються з іммобілізованими антигенами.

Після стадії промивки для видалення незв'язаних зразків і контрольного матеріалу в лунки вносяться кон'юговані з пероксидазою хрому анти-людські антитіла IgG. Під час другої інкубації цей анти-IgG кон'югат специфічно зв'язується з IgG-антитілами, що призводить до утворення ферментно-зв'язаних імунних комплексів.

Після другого етапу промивання для видалення незв'язаного кон'югату сформовані імунні комплекси (в разі позитивного результату) визначаються в ході інкубації з субстратом ТМБ з утворенням синього кольору. Синій колір змінюється на жовтий шляхом зупинки ферментної реакції індикатора з сірчаною кислотою.

Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості специфічних антитіл класу IgG Мікоплазми пневмонії в зразку пацієнта.

Поглинання при 450 нм зчитується за допомогою ІФА рідера.

3 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Набір призначений тільки для in vitro діагностики. Тільки для професійного використання.
- Перед початком дослідження прочитайте інструкцію повністю й уважно. Використовуйте дійсну версію інструкції, прикладену до набору. Переконайтеся, що вам все зрозуміло.
- Всі реагенти цього набору, які містять сироватку або плазму людини, були протестовані і показали негативний результат на HIV I/II, HBsAg та HCV за методами схваленим FDA. Однак, не існує методів, що гарантують повну відсутність цих речовин. Тому, всі продукти людської крові, включаючи зразки сироватки, повинні вважатися потенційно небезпечними.
- Уникайте контакту зі стоп розчином - 0.2 моль/л H₂SO₄. Це може викликати подразнення шкіри або опіки. При контакті промити великою кількістю води.
- Розчин субстрату ТМБ має подразнюючий ефект на шкіру та слизові. У разі контакту, промийте очі з великим об'ємом води і шкіру з милом і великою кількістю води. Промийте забруднені об'єкти перед повторним використанням. У разі вдихання реагентів, виведіть людини на свіже повітря.
- Мікротитровий планшет складається зі смужок, які відриваються. Невикористані лунки повинні зберігатися при 2-8 °C в пакеті з фольги і використовуватися з рамкою, що надається.
- Піпетування зразків та реагентів повинне здійснюватися якомога швидше і з однаковими часовими інтервалами. Впевніться, що необхідні реагенти, матеріали та пристрої готові перед початком аналізу.
- Використовуйте резервуари тільки для окремих реагентів. Це особливо стосується субстрату. Використовуючи резервуар для дозування розчину субстрату, який раніше використовувався для розчину кон'югату, може призвести до забарвлення розчину.
- Змішуйте вміст лунок ретельно, щоб забезпечити хороші результати випробувань. Не використовуйте повторно мікропланшет.

- Не дозволяйте лункам висохнути; додавайте реагенти негайно після завершення стадії ополіскування.
- Дозволити реагентам нагрітися до кімнатної температури (21-26 °C) перед початком випробування. Температура буде впливати на показання оптичної щільності аналізу. Проте, значення для зразків пацієнтів не будуть порушені.
- Ніколи не піпетувати ротом і уникайте контакту реагентів і зразків зі шкірою і слизовими оболонками.
- Не палити, не їсти, не пити і не застосовувати косметику в тих місцях, де обробляються зразки або реагенти набору.
- Одягати одноразові латексні рукавички при роботі зі зразками і реагентами. Мікробне забруднення реагентів чи зразків може давати помилкові результати.
- Роботи зі зразками та реагентами повинні здійснюватися відповідно до процедур, визначених відповідними національними правилами біологічної безпеки.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
- Всі зазначені обсяги повинні бути виконані відповідно до протоколу. Оптимальні результати випробувань будуть отримані тільки при використанні каліброваних піпеток і зчитувачів мікропланшету.
- Не слід змішувати або використовувати компоненти з наборів з різними номерами лотів. Рекомендуються не змінювати місцями лунки різних пластин навіть одного і того ж лоту. Набори можуть транспортуватися або зберігатися в різних умовах і зв'язуючі характеристики пластин можуть давати дещо інші результати.
- Хімікати і приготвлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи.
- Для отримання інформації про небезпечні речовини, включені в набір, будь ласка, зверніться до Паспорта безпеки. Паспорти безпеки для даного продукту надаються за запитом безпосередньо від DRG.

4 КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Лунки мікропланшету**, 12 x 8 (відривні) смужки, 96 лунок; Лунки покриті антигеном Мікоплазми пневмонії. (вкл. 1 тримач для стрипів і 1 плівку для накривання)
2. **Розчинник для зразків***, 1 флакон, 100 мл, готовий до використання, жовтого кольору; pH 7.2 ± 0.2.
3. **Позитивний Контроль***, 1 флакон, 1.0 мл, готовий до використання; жовтого кольору, червоної ковпачок.
4. **Негативний Контроль***, 1 флакон, 2.0 мл, готовий до використання; жовтого кольору, жовтий ковпачок.
5. **Cut-off Контроль***, 1 флакон, 2.0 мл, готовий до використання; жовтого кольору, чорний ковпачок.
6. **Ферментний кон'югат***, 1 флакон, 20 мл, готовий до використання, червоного кольору, антитіла до людського IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому.
7. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, тетраметилбензидин (ТМБ).
8. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, містить 0.2 моль/л H₂SO₄, Уникайте контакту зі стоп-розчином. Це може викликати подразнення шкіри і опіки.
9. **Промивний розчин***, 1 флакон, 30 мл (Концентрат 20X на 600 мл), pH 6.5 ± 0.1

*містять не ртутний консервант

4.1.1 Матеріали, що не постачаються, але є необхідними

- Мікротитровий відкалібрований рідер (450/620 нм ± 10 нм).
- Відкалібровані регульовані точні мікропіпетки.
- Інкубатор 37 °C
- Ручне або автоматичне обладнання для промивки лунок
- Вортекс
- Деіонізована або (свіжо) дистильована вода
- Таймер
- Абсорбуючий папір

4.2 Зберігання та стабільність набору

При зберіганні при температурі 2-8 °C активність реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати.

Відкриті реагенти та лунки повинні зберігатися при 2-8 °C. Мікролунки повинні зберігатися при 2-8 °C. Після відкриття мішечка із фольги треба знову його герметично закрити.

Відкритий набір стабільний 2 місяців при зберіганні, як вказано вище.

4.3 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість смужок до кімнатної температури.

Промивний розчин

Розвести Промивний Розчин 1+19 (наприклад, 10 мл + 190 мл) свіжою очищеною від бактерій редистильованою водою. Цей розбавлений розчин для промивання має значення рН 7.2 ± 0.2 .

Витрата: ~ 5 мл на визначення.

Кристали в розчині зникають при нагріванні до 37 °C на водяній бані.

Переконайтеся, що кристали повністю розчиняються перед використанням.

Розведений розчин для промивання стабільний протягом 4 тижнів при температурі 2-8 °C.

4.4 Утилізація набору

Утилізацію набору слід проводити відповідно до вимог техніки безпеки. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки.

4.5 Пошкодження набору

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Окремі пошкоджені компоненти не слід використовувати.

5 ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Сироватка або плазма (ЕДТА-, гепаринова або цитратна* плазма) можуть використовуватись в даному аналізі. (Якщо *цитратна плазма використовується, результати можуть бути трохи нижче.)

Не слід використовувати гемолітичні, жовтяничні або ліпемічні зразки.

5.1 Забір Зразка

Сироватка:

Проведіть забір крові венепункцією (напр. Sarstedt Monovette для сироватки); дозвольте їй згорнутись; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного зсідання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитися більше часу для згортання крові.

Плазма:

Цільна кров повинна бути зібрана в центрифужні пробірки, що містять антикоагулянт (наприклад, Sarstedt Monovette з відповідною підготовкою плазми) і центрифугувана відразу після збору.

5.2 Підготовка та зберігання зразків

Зразки закриті кришками і зберігати до 5 днів при 2-8 °C перед аналізом. Зразки, які зберігаються на протязі більш тривалого часу мають бути заморожені тільки один раз при температурі від -20 °C перед аналізом. Відталі зразки повинні бути кілька разів перевернуті перед аналізом.

5.3 Розведення зразків

До початку випробування розбавити кожен зразок пацієнта 1+100 Розчином для розведення зразків; добре перемішати, дати постояти 15 хвилин, знову добре перемішати.

Будь ласка, зверніть увагу: Контролі готові до використання і не потребують розведення!

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Доведіть всі реагенти, зразки та контролі до кімнатної температури перед початком дослідження!
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакові інтервали часу.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.
- Закрийте флакони з реагентами щільно відразу після використання, щоб уникнути випаровування і мікробного забруднення.
- Щоб уникнути перехресного забруднення і помилково завищених результатів піпетувати зразки пацієнтів і вносити кон'югат без розбризування на дно лунок.
- Протягом інкубації при 37 °C накривати мікротитрові смужки фольгою, щоб уникнути випаровування.

6.2 Процедура дослідження

До початку аналізу розведіть Промивний Розчин, підготуйте зразки пацієнтів, як описано в пункті 5.3 та підготуйте схему розподілу та ідентифікації, що поставляється в наборі, для всіх зразків і контролів.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитровий лунок у штативі.

Будь ласка, розмістіть щонайменше:

1 лунку	(наприклад, A1)	для бланка субстрату,
1 лунку	(наприклад, B1)	для Нег. Контролю,
2 лунки	(наприклад, C1+D1)	для Cut-off Контролю
1 лунку	(наприклад, E1)	для Поз. Контролю.

Користувач вирішує, чи проводити визначення контролів і зразків пацієнтів в двох примірниках.

2. Внести 100 мкл Нег. Контролю в лунку B1
100 мкл Cut-off Контролю в лунки C1 і D1
100 мкл Поз. Контролю в лунку E1 і
100 мкл кожного розведеного зразка з новими одноразовими наконечниками у відповідні лунки.
Залиште лунку A1 для бланка субстрату!
3. Накрити лунки плівкою, що поставляється в наборі. Інкубувати протягом 60 хвилин при 37 °C.
4. Вилийте різко вміст лунок.
Промийте лунки 5 разів розведеним Промивним Розчином (300 мкл на лунку). Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.
Важливе зауваження:
Чутливість і точність цього аналізу залежать від правильності проведення процедури промивання!
5. Внесіть 100 мкл Ферментного Кон'югату в кожну лунку, крім A1.
6. Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі (20-25 °C).
Не піддавати впливу прямих сонячних променів!
7. Вилийте різко вміст лунок.
Промийте лунки 5 разів розведеним Промивним Розчином (300 мкл на лунку). Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.
8. Додайте 100 мкл Розчину Субстрату в кожну лунку.
9. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі (20-25 °C) в темноті.
10. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши 100 мкл Стоп Розчину в кожну лунку.
Будь-яке блакитне забарвлення, яке проявилось під час інкубації, змінюється на жовте.
Примітка: Високо позитивні зразки пацієнтів можуть мати темний осад хромогену!
11. Визначте абсорбцію (ОЩ) кожної лунки при 450/620 нм за допомогою мікротитрового планшет-рідера протягом 30 хвилин після додавання Стоп Розчину.

6.3 Вимірювання

Налаштуйте мікропланшетний зчитувач на нуль, використовуючи субстрат бланку в лунці A1.

Якщо - з технічних причин - рідер не може бути налаштований на нуль використовуючи субстрат бланку в лунці A1, відняти значення абсорбції лунки A1 з усіх інших значень абсорбції, щоб отримати достовірні результати!

Виміряти абсорбцію у всіх ланках при довжині хвилі 450 нм і записати значення абсорбції для кожного контролю і зразка пацієнта в плані розподілу та ідентифікації.

Рекомендується подвійне зчитування довжини хвилі 620 нм в якості еталонної довжини хвилі.

Там, де це може бути застосовано, **розрахувати середнє значення абсорбції** всіх дублів.

7 РЕЗУЛЬТАТИ

7.1 Оцінка роботи тесту

Тест може вважатися дійсним при дотриманні наступних умов:

Субстрат Бланк в A1:	Значення абсорбції нижче 0.100
Нег. Контроль в B1:	Значення абсорбції нижче 0.200
Cut-off Контроль в C1/D1:	Значення абсорбції між 0.350 - 0.850
Поз. Контроль в E1:	Значення абсорбції між 0.650 - 3.000

7.2 Розрахунок

Середнє значення абсорбції **Cut-off Контролю [CO]**

Обчислити середнє значення абсорбції двох (2) визначень **Cut-off Контролю** (наприклад, в C1/D1).

Приклад: $(0.49 + 0.51) / 2 = 0.50 = CO$

7.3 Інтерпретація

ПОЗИТИВНИЙ

Значення (середні) оптичної щільності пацієнта більше ніж на 10% вище CO
(Середня ОЩ_{пацієнта} > 1.1 x CO)

СІРА ЗОНА

Значення (середні) оптичної щільності пацієнта від 10% вище до 10% нижче CO

Повторити тест через 2-4 тижні - з **новими** зразками пацієнтів

(0.9 x CO ≤ Середня ОЩ_{пацієнта} ≤ 1.1 x CO)

Результати в повторному тесті знову в сірій зоні ⇒

НЕГАТИВНИЙ

Значення (середні) оптичної щільності пацієнта більше ніж на 10% нижче CO

(Середня ОЩ_{пацієнта} < 0,9 x CO)

7.3.1 Результати в DRG Одиницях [DU]

Значення (середнє) оптичної щільності пацієнта x 10 / CO = [Одиниці DRG
Одиниці = DU]

Приклад: 1.580 x 10 / 0.50 = 32 DU

Інтерпретація результатів

Значення Cut-off: 10 DU
Сіра зона: 9 - 11 DU
Негативний: < 9 DU
Позитивний: > 11 DU

8 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контролі згідно з державними і місцевими правилами. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролі і нормального рівня, і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовуватись національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають в установленні границі матеріалів контролю, результати являються не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться між 2.67 - 60 DU/мл.

9.2 Аналітична чутливість

Аналітична чутливість DRG ELISA розраховувалася шляхом додавання 2 стандартних відхилень від середнього значення 20 повторів аналізу негативного контролю і становить 2.67 DU/мл (OD₄₅₀ = 0.150).

9.3 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність визначається як ймовірність аналізу дати негативний результат при відсутності специфічного аналіту. (Виявлено в порівнянні з методом Virion-Serion ELISA, з трьома лотами DRG ELISA. Було аналізовано 74 зразка, з них 35 негативних).
Це становить 100% для всіх трьох лотів DRG.

9.4 Діагностична чутливість

Діагностична чутливість визначається як ймовірність аналізу дати позитивний результат в присутності специфічного аналіту. (Виявлено в порівнянні з методом Virion-Serion ELISA, з трьома лотами DRG ELISA. Було аналізовано 74 зразка, з них 35 позитивних).
Це становить 92.11% для всіх трьох лотів DRG.

9.5 Порівняння методів

DRG Мікоплазми пневмонії IgG ELISA порівнювали з Virion-Serion Мікоплазми пневмонії IgG ELISA. Було аналізовано 74 зразка сироватки.

n= 74		Virion-Serion	
		pos.	neg.
DRG ELISA Lot 1	pos.	35	0
	neg.	3	35

Узгодження: 95.95%

9.6 Відтворюваність

9.6.1 Точність в аналізі тесту DRG Мікоплазми пневмонії IgG ELISA визначали за допомогою 20x вимірювань 12 зразків сироватки, що охоплюють весь діапазон вимірювання.

Sample	Mean OD ₄₅₀	Intra-Assay CV (%)	n
1	0,31	7,20	20
2	0,26	9,09	20
3	0,21	5,26	20
4	0,94	5,59	20
5	0,94	8,62	20
6	0,69	8,38	20
7	1,25	6,26	20
8	1,17	7,35	20
9	0,97	9,91	20
10	2,26	6,61	20
11	2,47	5,66	20
12	2,37	7,18	20

9.6.2 Точність між аналізами тесту DRG Мікоплазми пневмонії IgG ELISA визначали за допомогою 3 зразків з 2 наборами в 10 незалежних вимірюваннях по 2 дублі кожен.

Зразок	Середнє ОЩ ₄₅₀	КВ, %	К-сть
1	2.81	9.95	40
2	0.38	14.02	40
3	0.99	12.74	40

10 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Бактеріальне забруднення або повторні цикли заморожування-відтавання зразка можуть вплинути на значення абсорбції.

У пацієнтів з імунodefіцитом і новонароджених серологічні дані мають обмежене значення.

10.1 Інтерферуючі речовини

Гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0,5 мг/мл) і тригліцериди (до 30 мг/мл) не впливають на результати аналізу.

11 ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

Дослідження необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати в рамках процедури випробування достатню кількість контролів для оцінки правильності та точності тесту.

Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролі знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного дослідження і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3 Відповідальність

Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах дослідження. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

