

НАБІР РЕАГЕНТІВ

МІКОМПЛАЗМА PNEUMONIAE IgM ELISA

Mycoplasma pneumoniae IgM ELISA

Каталог. №: **EIA-3500**

Дата випуску інструкції: **2016/07**
Версія **14.0**



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 надає матеріали для якісного та напівкількісного визначення антитіл класу IgM до Мікоплазми пневмонії в сироватці або плазмі людини.

Цей тест призначений тільки для діагностики в лабораторних умовах.

2 ПРИНЦИП ТЕСТУ

Даний набір є твердофазним імуноферментним аналізом (ELISA).

Зразки пацієнта розводять *Розчинником для Зразків* та інкубують з *IgG-RF-Сорбентом*, що містить гіперімунні анти-людські IgG-антитіла, щоб усунути конкурентне зв'язування зі специфічними IgG, а також прибрати ревматоїдні фактори. Дана попередня підготовка допомагає уникати хибно позитивних і хибно негативних результатів.

Мікротитрові лунки в якості твердої фази покриті антигенами Мікоплазми.

Попередньо підготовлені зразки пацієнта і **готові до використання контролю** вносять в лунки. Під час інкубації специфічні до мікоплазми пневмонії антитіла позитивних зразків і контролів зв'язуються з іммобілізованими антигенами.

Після промивання (для видалення незв'язаних зразків і контролів) в лунки додаються антитіла IgM, кон'юговані пероксидазою хрому. Під час другої інкубації цей анти-IgM кон'югат зв'язується тільки з антитілами IgM, в результаті чого формуються імунні комплекси з ферментативними зв'язками.

Після другого промивання (для видалення незв'язаного кон'югату) сформовані імунні комплекси (в разі позитивного результату) визначаються в ході інкубації з субстратом ТМБ, в результаті чого з'являється блакитне забарвлення. Блакитний колір змінюється на жовтий при додаванні сірчаної кислоти для зупинки індикаторної реакції.

Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості в зразку антитіл IgM, специфічних до мікоплазми пневмонії.

Абсорбція зчитується при 450 нм на мікропланшетному ІФА-рідері.

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 and 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 уникати 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 мікропланшета.
- Не слід змішувати або використовувати компоненти з наборів з різними номерами лотів. Рекомендується 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 приготовлені 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 мікропланшета**, 12 x 8 (відривні) смужки, 96 лунок; Лунки покриті антигенами 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. **IgG-RF-Сорбент***, 1 флакон, 6.5 мл, готовий до використання, жовтого кольору; Містить антитіла до людського IgG.
4. **Позитивний Контроль***, 1 флакон, 1.0 мл, готовий до використання; жовтого кольору, червоний ковпачок.
5. **Негативний Контроль***, 1 флакон, 2.0 мл, готовий до використання; жовтого кольору, жовтий ковпачок.
6. **Cut-off Контроль***, 1 флакон, 2.0 мл, готовий до використання; жовтого кольору, чорний ковпачок.
7. **Ферментний кон'югат***, 1 флакон, 20 мл, готовий до використання, червоного кольору, антитіла до людського IgM, кон'югованого з пероксидазою хрому.
8. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, тетраметилбензидин (ТМБ).
9. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, містить 0.2 моль/л H₂SO₄, Уникати контакту зі стоп-розчином. Це може викликати подразнення шкіри і опіки.
10. **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 °С активність реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати.

Відкриті реагенти повинні зберігатись при 2-8 °С. Мікролунки повинні зберігатись при 2-8 °С. Після відкриття мішечка із фольги треба знову його герметично закрити.

Відкритий набір стабільний протягом 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 °С на водяній бані. Переконайтеся, що кристали повністю розчиняються перед використанням.

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

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

5 ЗРАЗКИ

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 зсідання 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 Зберігання та підготовка зразків

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

5.3 Розведення зразків

Перед аналізом розбавити кожен зразок пацієнта *Розчином для Розведення Зразків*. Для поглинання ревматоїдного фактору ці зразки потім в розведеному вигляді повинні бути інкубовані з *IgG-RF-Сорбентом*

1. Розвести кожен зразок пацієнта **1+50** з *Розчинником Зразка*; Наприклад, 10 мкл зразка + 0.5 мл *Розчинника Зразків*. **Добре перемішати.**
2. Добре перемішати *IgG-RF-Сорбент* перед використанням.
3. Розвести цей попередньо розведений зразок **1+1** з *IgG-RF-Сорбентом* Наприклад, 60 мкл попередньо розведеного зразка + 60 мкл *IgG-RF-Сорбенту*. **Добре перемішати**
4. **Дайте постояти протягом принаймні 15 хвилин при кімнатній температурі або протягом ночі при температурі 2-8 °С і знову добре перемішати.**
5. Візьміть по 100 мкл цих попередньо підготовлених зразків для ІФА.

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

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- **Доведіть всі реагенти, зразки та контролю 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 °С 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 мікротитрові лунок у штативі.

Будь ласка, розмістіть щонайменше:

1 лунку (наприклад, А1) для бланка субстрату,

1 лунку (наприклад, В1) для *Нег. Контролю*,

2 лунки (наприклад, С1+D1) для *Cut-off Контролю*

1 лунку (наприклад, Е1) для *Поз. Контролю*.

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

2. Внести

100 мкл *Нег. Контролю* в лунку В1

100 мкл *Cut-off Контролю* в лунки С1 і D1

100 мкл *Поз. Контролю* в лунку Е1 і

100 мкл кожного розведеного зразка з новими одноразовими наконечниками у відповідні лунки.

Залиште лунку А1 для бланка субстрату!

3. Накрити лунки плівкою, що поставляється в наборі. Інкубувати протягом **60 хвилин при 37 °С**.

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 А1**.

6. Інкубуйте **30 хвилин при кімнатній температурі (20-25 °С)**.

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 °С) в темноті**.

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 А1**.

Якщо - з технічних причин - рідер не може бути налаштований на нуль використовуючи субстрат бланку в лунці А1, відняти значення абсорбції лунки А1 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 А1: Значення абсорбції **нижче 0.100**

Нег. Контроль в В1: Значення абсорбції **нижче 0.300**

Cut-off Контроль в С1/D1: Значення абсорбції **між 0.350 - 0.850**

Поз. Контроль в Е1: 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 С1/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

$(0.9 \times CO \leq \text{Середня ОЩ}_{\text{пацієнта}} \leq 1.1 \times CO)$

Результати в повторному тесті знову в сірій зоні ⇒

НЕГАТИВНИЙ

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 = DU]

Приклад: $1.580 \times 10 / 0.50 = 32 DU$

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 межі 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 2.53 - 60 DU/мл.

9.2 Аналітична чутливість

Аналітична чутливість DRG ELISA розраховувалася шляхом додавання 2 стандартних відхилень від середнього значення 20 повтор аналізу негативного контролю і становить 2.53 DU/мл (OD₄₅₀ = 0.108).

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. 82 зразка, з них 73 негативних зразки були аналізовані).
Це становить 100% (для всіх трьох партій).

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. Були аналізовані 82 зразка, з них 9 позитивних).

Це становить 100% для всіх трьох лотів DRG.

9.5 Порівняння методів

DRG Мікоплазми пневмонії IgM ELISA порівнювали з іншим Мікоплазми пневмонії IgM ELISA (Virion-Serion). 82 зразки сироватки/плазми були аналізовані.

	n= 82	Virion-Serion	
		pos.	neg.
DRG ELISA	pos.	9	0
	neg.	0	73

Узгодження: 100%

9.6 Відтворюваність

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

Sample	Mean OD ₄₅₀	Intra-Assay CV (%)	n
1	0,16	4,32	20
2	0,13	4,19	20
3	0,22	8,92	20
4	0,92	3,47	20
5	0,69	5,51	20
6	0,88	4,58	20
7	1,08	4,72	20
8	1,21	5,81	20
9	1,47	3,95	20
10	1,58	3,52	20
11	1,76	3,05	20
12	1,73	5,60	20

9.6.2 Точність між аналізами тесту DRG Мікоплазми пневмонії IgM 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	1.95	7.97	40
2	1.47	8.60	40
3	1.35	9.33	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.

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

ДРГ Інструментс ГмбХ
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

