ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ТЕСТ-НАБОРА
Mycoplasma pneumoniae – IgA- ELISA medac
Иммуноферментный анализ для количественного определения IgA-антител к ***Mycoplasma pneumoniae*** в человеческой сыворотке.

Кат. № 361

Только для ***in vitro*** диагностики

ВВЕДЕНИЕ

Микоплазмы – это бактерии «без клеточной стенки» (Класс Mollicutes = мягкокожие, отряд Mycoplasmatales) с особенно маленьким геномом. Они характеризуются своим небольшим размером (300-800 нм) и способностью к изменчивости форм (плеоморфизм). В настоящее время известно свыше 100 видов бактерий отряда Mycoplasmatales. Большинство из них встречаются исключительно у животных. У человека было выделено 14 видов. Они колонизируют на мукозных мембранах респираторного и урогенитального трактов.Только несколько из них являются патогенными. Из них особенно выделяется ***Mycoplasma pneumoniae***. Известно два варианта ***Mycoplasma pneumoniae.***

Mycoplasma pneumoniae – внеклеточный паразит слизистой респираторного тракта. Патоген характеризуется высоким уровнем специфичности к «хозяину». Особый адгезин патогена позволяет плотно соединиться с поверхностью «хозяйской» клетки. Данный адгезин также является фактором вирулентности, против которого направлен гуморальный ответ. Инфекция передается воздушно-капельным путем, но инкубационный период довольно длительный и составляет от 10 до 20 дней.

Инфекции, вызываемые ***Mycoplasma pneumoniae*** чаще всего эндемичны, с возможными сезонными пиками весной и осенью. Интервалы между эпидемиями составляют 3-4 года. Инфекции, вызываемые ***Mycoplasma pneumoniae***, в большинстве случаев «сочетанные», являются причиной трахеобронхитов и атипичной пневмонии у детей и молодых людей. Наибольшая распространенность ***Mycoplasma pneumoniae*** отмечается в возрасте от 5 до 15 лет. Из всех случаев атипичной пневмонии в 5-10% причиной является ***Mycoplasma pneumoniae***. Также ***Mycoplasma pneumoniae*** приводит к фарингитам, ларингитам, воспалениям среднего уха и миринготам. Вслед за поражением респираторного тракта, вызываемым ***Mycoplasma pneumoniae***, могут поражаться и другие органы и системы, что приводит к перикардитам и миокардитам, реактивным артритам, менингитам, менингоэнцефалитам и полиневритам вместе с разнообразными по проявлению поражениями кожных покровов. Эта, на первый взгляд безобидная, инфекция может привести к серьезным последствиям. Особенно тяжелое течение заболевания встречается у лиц с иммунодефицитом и иммуносупрессией.

Предшествующие атаки инфекции, вызываемой ***Mycoplasma pneumoniae***, не дают стойкого иммунитета к данному патогену. Часто встречаются случаи повторного инфицирования.
У детей до 5 –летнего возраста инфекция, преимущественно, протекает асимптоматично. В некоторых случаях заболевание приобретает легкое течение.
У детей старшего возраста, а также у подростков и взрослых, заболевание сопровождается упадком сил, головной болью, жаром и сухостью, непродуктивным кашлем. Однако, данные проявления не являются строго специфичными для инфекции, вызываемой ***Mycoplasma pneumoniae***. Необходимо эффективное диагностическое исследование.

В острой стадии заболевания определение возбудителя является методом выбора, для чего используются мазок из горла, образцы мокроты и смывы из бронхоальвеолярного дерева. Классическая техника диагностики ***Mycoplasma pneumoniae*** - культуральный метод - занимает много времени (10-14 дней).
И тем не менее, выделение микроорганизма проходит успешно только в 40-60% случаев. ИФА тесты для определения антигена требуют большого количества клеточного материала, а потому чувствительность тестов довольно низкая. Эффективных качественных ДНК тестов для диагностики данного патогена очень мало.

Таким образом, методом выбора для пациентов с хронической инфекцией, вызванной ***Mycoplasma pneumoniae***, реинфекцией или экстрапульмональными заболеваниями является серологический метод. Существует несколько коммерческих методов: тест связывания комплемента, гемагглютинация и ИФА. В отличие от теста связывания комплемента и гемагглютинации, ИФА определяет иммуноглобулины классов IgG, IgA и IgM, что позволяет дифференцировать острую, хроническую и прошедшую инфекции.

В тест-системе **Mycoplasma pneumoniae -IgA- ИФА medac** используются несколько рекомбинантных антигенов, что позволяет получать результаты с высокой специфичностью и чувствительностью. Кроме того, количественный расчет по конечной точке (УЕ/мл) дает возможность получать воспроизводимые результаты.

Помимо тест-набора **Mycoplasma pneumoniae -IgA- ИФА medac**
Кат. № **361** для 96 определений,

Мы предлагаем также: **Mycoplasma pneumoniae -IgG- ИФА medac**
Кат. № **360** для 96 определений,
Mycoplasma pneumoniae -IgM- ИФА medac
Кат. № **362** для 96 определений.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Микропланшета покрыта специфичным рекомбинантным антигеном ***M. Pneumoniae***.
Специфичные ***M. Pneumoniae*** антитела из образцов сыворотки связываются с антигеном.
Конъюгированные пероксидазой анти-человеческие IgA антитела связываются с IgA антителами.
Инкубация с ТМБ-субстратом. Реакция останавливается добавлением стор раствора
Абсорбция считывается фотометрически.

ПРЕИМУЩЕСТВА ТЕСТА

- Ломающиеся стрипы позволяют эффективно использовать тест.
- Подходит для автоматического открытого ИФА оборудования.
- Количественный расчет по конечной точке; не требуется построение стандартной кривой.

СОСТАВ НАБОРА
КАТ. № 361

1. **Микропланшета**: 12 X 8 лунок, маркированы «желтым», (с рамкой и влагопоглотителем, в вакуумнозаклеенным алюминизированном пакете), ломающиеся, U-образной формы, покрыты рекомбинантным антигеном *M. Pneumoniae* и FCS, готова к использованию.
2. **Отрицательный контроль**: 1 флакон по 1,5 мл , человеческая сыворотка, готов к использованию, окрашен в синий цвет, содержит NBCS, фенол, ПроКлин™ 300 и гентамицина сульфат.
3. **Положительный контроль**: 1 флакон по 1,5 мл в каждом, человеческая сыворотка, готов к использованию, окрашен в синий цвет, содержит NBCS, фенол, ПроКлин™ 300 и гентамицина сульфат.
4. **Калибратор**: 1 флакон по 1,5 мл в каждом, человеческая сыворотка, готов к использованию, окрашен в синий цвет, содержит NBCS, фенол, ПроКлин™ 300 и гентамицина сульфат.
5. **Промывающий буфер**: 1 флакон, 100 мл, PBS/Tween (10X), pH 7,2 - 7,4 , содержит ПроКлин™ 300.
6. **Разбавитель образцов**: 1 флакон, 110 мл, PBS/Tween/ NBCS, pH 7,0 – 7,2, готов к использованию, окрашен в синий цвет, содержит ПроКлин™ 300.
7. **Конъюгат**: 3 флакона по 4,5 мл в каждом, козьи анти-человеческие IgA, конъюгированный пероксидазой, готов к использованию, окрашен в желтый цвет, содержит BSA, фенол, ПроКлин™ 300 и гентамицина сульфат.
8. **ТМБ-субстрат**: 1 флакон, 10 мл, готов к использованию.
9. **Стоп-раствор**: 2 флакона по 11 мл в каждом, готов к использованию.

1. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Материал/реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Тест-набор	закрытый	2-8° C	До окончания срока годности
Микропланшета	открытая	2-8° C в пакете с влагопоглотителем	12 недель
Контроли/Калибратор	открытые	2-8° C	12 недель
Промывающий буфер	разведенный	2-8° C	12 недель
Разбавитель образцов	открытый	2-8° C	12 недель
Конъюгат	открытый	2-8° C	12 недель
ТМБ-субстрат	открытый	2-8° C	12 недель
Стоп-раствор	открытый	2-8° C	До окончания срока годности

Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

2. НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР.

2.1. Вода для инъекций. Использование деионизированной воды может привести к ошибкам в процедуре теста.
2.2. Микропипетки с изменяемым объемом.
2.3. Чистые стеклянные или пластиковые сосуды для разведения промывающего буфера и образцов.
2.4. Оборудование для промывания микропланшеты (мультистеппер или ИФА вошер).
2.5. Инкубатор на 37° C.
2.6. Микропланшетный ридер с фильтрами на 450 нм и 620 – 650 нм.

3. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

До начала процедуры теста все компоненты набора должны быть комнатной температуры.
Рассчитайте необходимое количество лунок.

3.1. Микропланшета: После извлечения необходимого числа лунок пакет следует герметично запечатать вместе с влагопоглотителем. Условия хранения и стабильность указаны в пункте 1.
3.2. Промывающий буфер: Смешайте 1 часть промывающего буфера (10X) с 9 частями воды для инъекций (т.е. 50 мл промывающего буфера (10X) и 450 мл воды). Для промывания 8 лунок необходимо 10 мл разведенного промывающего буфера.

Кристаллы, образовавшиеся в промывающем буфере (10X), растворяются при нагревании (макс. 37° C) и/или при встряхивании при комнатной температуре.
Не смешивайте специфичные реагенты (микропланшета, контроли, калибратор, конъюгат) из различных лотов. В то же время разбавитель образцов, промывающий буфер, ТМБ-субстрат и стоп-раствор могут быть использованы во всех тест-наборах Medac для определения антител к Chlamydia и Mycoplasma.

Не используйте реагенты из тест-наборов других производителей.

Валидные и воспроизводимые результаты можно получить только при строгом соблюдении процедуры теста.

4. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

4.1. В тесте используется только **сыворотка.**
4.2. Специальная подготовка сыворотки (т.е. инактивация) не требуется. Однако сыворотка не должна быть контаминирована микроорганизмами и содержать эритроциты.
4.3. Сыворотку необходимо развести в соотношении 1:100 разбавителем образцов.

5.A. ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

5.1. Вскройте алюминизированный пакет выше «застежки», и достаньте необходимое количество микролунок (см. 3.1.).

Микролунки готовы к использованию и не нуждаются в предварительном промывании.

5.2. Раскапайте 50 мкл разбавителя образцов в лунку A1 как бланк (см. 6.A.).
Раскапайте по 50 мкл отрицательного контроля, положительного контроля и разведенных образцов в единичном определении, и по 50 мкл калибратора в дубле.
Если необходимо, микролунки можно выдержать во влажной камере до 30 минут при комнатной температуре перед продолжением процедуры теста.
5.3. Инкубируйте микролунки 60 минут (± 5 минут) при температуре 37° C (± 1° C) во влажной камере или заклеенными инкубационной пленкой.
5.4. После инкубации промойте микролунки 3 раза по 200 мкл промывающего буфера на лунку. Следите, чтобы все лунки были заполнены. После промывания вытряхните лунки на фильтровальную бумагу.
Не позволяйте лункам высохнуть! Незамедлительно используйте!
5.5. Раскапайте конъюгат (окрашен в зеленый цвет) в каждую лунку.
При ручной постановке теста в каждую лунку пипетируется 50 мкл конъюгата.
Пожалуйста, помните: Если тест проводится в автомате, в каждую лунку пипетируется по 60 мкл конъюгата, что обусловлено повышенным испарением в инкубационной камере автомата.
Совместимость теста с автоматическим оборудованием была подтверждена в течение оценки теста. Тем не менее, мы рекомендуем уточнить совместимость теста с оборудованием, имеющимся в вашей лаборатории.
5.6. Инкубируйте микролунки 60 минут (± 5 минут) при температуре 37° C (± 1° C) во влажной камере или заклееными инкубационной пленкой.
5.7. После инкубации промойте лунки снова (см. 5.4.).
5.8. Раскапайте по 50 мкл ТМБ - субстрата в каждую лунку и инкубируйте в течение 30 минут (± 2 минуты) при температуре 37° C (± 1° C) во влажной камере или заклеенными инкубационной пленкой в темноте.
Положительные образцы окрасятся в синий (голубой) цвет.
5.9. Реакция останавливается добавлением 100 мкл стоп - раствора в каждую лунку. Положительные образцы окрасятся в желтый цвет.
Перед фотометрическим считыванием протрите наружную поверхность лунок и убедитесь в отсутствии пузырьков воздуха в лунках.
Фотометрическое считывание производится в течение 15 минут после добавления стоп - раствора!

5.B. ТАБЛИЦА РАБОЧЕЙ ПРОЦЕДУРЫ ТЕСТА

	Бланк (A1)	**Отрицат. контроль**	**Положит. контроль**	**Калибратор**	**Образцы**
Разбавитель образцов					
Отр. Контроль	50 мкл	--	--	--	--
Пол. Контроль	--	50 мкл	--	--	--
Калибратор	--	--	50 мкл	--	--
Образцы	--	--	--	50 мкл	--
	--	--	--	--	50 мкл
Инкубировать 60 мин. при 37° C, промыть 3 раза по 200 мкл промывающим буфером.					
Конъюгат	50/60 мкл*	50/60 мкл*	50/60 мкл*	50/60 мкл*	50/60 мкл*
Инкубировать 60 мин. при 37° C, промыть 3 раза по 200 мкл промывающим буфером.					
ТМБ-субстрат	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Инкубировать 30 мин. при 37° C, в темноте.					
Стоп - раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Фотометрическое считывание при 450 нм (референс 620 – 650 нм)					

***) ручная/автоматическая процедура теста (см. 5.5.)**

6.A. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ (ВАЛИДНОСТЬ)

- Результаты оцениваются в Условных Единицах (УЕ).
- Считывание значений Оптической Плотности (ОП) производится при длине волны 450 нм (референс 620 – 650 нм).
- Вычтите значение ОП бланка (лунка A1) из всех других значений ОП.
- Лот-специфичные данные
  К набору прилагается лист с лот-специфичными данными, содержащий следующую информацию:
  - Лот-специфичная калибровочная кривая
  - Значения a и b кривой
  - Номинальное значение ОП калибратора
  - Нижняя граница значения ОП калибратора
  - Номинальное значение концентрации (УЕ/мл) Положительного контроля.
- Критерии валидности

  - Значение **ОП бланка** должно быть **< 0,100**
  - Значение **ОП Отрицательного контроля** должно быть **< 0,100**
  - Значение **ОП Положительного контроля** должно укладываться в номинальные значения, указанные на листе с лот-специфичными данными.
  - Среднее значение ОП калибратора должно быть не менее значения нижней границы, указанной на листе с лот-специфичными данными.

  Тест необходимо повторить, если результаты не совпадают со спецификацией.
  - Коррекция результатов
  -

Полученные значения ОП Положительного контроля и образцов необходимо скорректировать по следующей формуле:

$$\text{ОП скорректир.} = \frac{\text{Номинальное значение ОП калибратора}}{\text{Полученное значение ОП калибратора}} \times \text{ОП}$$

- Расчет результатов
  Соответствующие концентрации скорректированных значений ОП в УЕ/мл
  Могут быть считаны с лот-специфичной калибровочной кривой (см. лист с лот-специфичными данными).
  Как альтернатива, концентрации могут быть рассчитаны по следующей формуле:

$$\text{Концентрация [УЕ/мл]} = b/\left|\frac{a}{\text{ОП скоррект.}} - 1\right|$$

Большинство современных ИФА ридеров позволяют ввести формулу в программу, что позволяет полностью автоматизировать процесс.
Исследуемый диапазон составляет от 9 до 125 УЕ/мл. Образцы со значениями ниже данного диапазона интерпретируются как < 9 УЕ/мл, а со значениями выше > 125 УЕ/мл. Данные значения не экстраполируются.

Cut-off = 10 УЕ/мл
Серая зона = 9-11 УЕ/мл

6.B. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ / ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Образцы со значениями меньше нижней границы Серой зоны считаются **Отрицательными.**
- Образцы со значениями, укладывающимися в Серую зону считаются **Сомнительными.** Такие образцы необходимо протестировать повторно через 14 дней вместе со свежим образцом сыворотки для определения изменения титра.
- Образцы со значениями больше верхней границы Серой зоны считаются **Положительными.**
- Результаты всегда должны интерпретироваться в соответствии с клиническими данными и дополнительными диагностическими параметрами.
- Высокие концентрации гемоглобина не оказывают влияния на результаты, однако, высокие концентрации липидов могут повлиять на результаты теста.
- В некоторых случаях нельзя исключить перекрестные реакции с гетерофилическими антителами.

6.C. СПЕЦИФИЧНАЯ IgM-/ IgA-/ IgG- ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Возможные результаты			Интерпретация
IgM	**IgA**	**IgG**	
+	-	-	1. Ранняя стадия инфекции или персистенция IgM. Протестировать повторно IgM, IgA, IgG через 14 дней.
-	+	-	2. Ранняя стадия инфекции или персистенция IgA. Протестировать повторно IgA и IgG через 14 дней.
+	+	-	3.Острая инфекция. Протестировать IgG через 14 дней.
+	-	+	4. Острая инфекция
+	+	+	5. Острая инфекция
-	+	+	6. Текущая инфекция или реинфекция
-	-	+	7. Прошедшая инфекция. При наличии клинических проявлений протестировать повторно IgA и IgG через 14 дней.
-	-	-	8. Серологические данные отсутствуют. При наличии клинических проявлений протестировать повторно IgM, IgA и IgG через 14 дней.

Комментарии:
- Сомнительные результаты рекомендуется протестировать снова вместе с новым образцом сыворотки через 14 дней.
- Текущую или острую инфекции лучше всего тестировать в параллельном определении IgM и IgA антител.
- Одиночные IgM или IgA антитела чаще всего обнаруживаются у детей.
- У взрослых текущую инфекцию чаще всего отражают не IgM, а IgA антитела.

7. ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
В течение диагностической оценки были получены следующие представленные характеристики.

7.A. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬи СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Группы пациентов	**Специфичность IgA**
M. pneumoniae IgA отрицательные сыворотки (референс- ИФА/Агглютинация)	**98% (n = 40)**
Группы пациентов	**Чувствительность IgA**
Сыворотки с IgA антителами к ***M. pneumoniae*** (референс- ИФА/Агглютинация) Пациенты с респираторными инфекционными заболеваниями	**59% (n = 35)**

7.Б. ТОЧНОСТЬ

Образец	Внутритестовые отклонения				Образец	Внетестовые отклонения			
	Средн. Значен. УЕ	СО	КВ (%)	n		Средн. Значен. УЕ	СО	КВ (%)	n
ПК	12,3	0,7	6	22	**ПК**	13	0,5	4	13
№ 1	20,6	0,6	3	22	**№ 4**	21,7	1,1	5	13
№ 2	21,7	0,7	3	22	**№ 5**	20,8	1,2	6	13
№ 3	116	3,2	3	22	**№ 6**	114,7	11,2	10	13

ПК- положительный контроль,
СО- стандартные отклонения,
КВ (%)- коэффициент вариабельности

ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- Не путать флаконы и их крышки во избежание перекрестного загрязнения.
- Флаконы с реактивами после использования необходимо сразу же плотно закрыть во избежание испарения и микробного заражения.
- После использования реагенты должны храниться согласно предписаниям по хранению, чтобы обеспечить указанный срок годности.
- После использования все компоненты тест-набора должны храниться в оригинальной упаковке во избежание смешивания реагентов из разных тест-систем и партий.

УКАЗАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Следует придерживаться предписаний по технике безопасности для лабораторий.
- Реагенты, произведенные из человеческих биоматериалов, были протестированы и признаны отрицательными к HbsAg, антителам к HIV 1 и 2, и HCV. Однако, следует обращаться с данным материалом, как с потенциально инфицированным, соблюдая необходимые меры предосторожности.