

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ТЕСТ-НАБОРА *Mycoplasma pneumoniae* – IgM- ELISA medac

Иммуноферментный анализ для количественного определения IgM-антител к *Mycoplasma pneumoniae* в человеческой сыворотке.

Кат. № 362

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 миригитам. 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* -IgM- 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* -IgM- ИФА medac**
Кат. № 362 для 96 определений,

Мы предлагаем также: ***Mycoplasma pneumoniae* -IgG- ИФА medac**
Кат. № 360 для 96 определений,
***Mycoplasma pneumoniae* -IgA- ИФА medac**
Кат. № 361 для 96 определений.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Микропланшета покрыта высокоочищенным, специфичным антигеном *M. Pneumoniae*.

Специфичные *M. Pneumoniae* антитела из образцов сыворотки связываются с антигеном.

Конъюгированные пероксидазой анти-человеческие IgA антитела связываются с IgM антителами.

Инкубация с ТМБ-субстратом. Реакция останавливается добавлением стоп раствора. Абсорбция считывается фотометрически.

ПРЕИМУЩЕСТВА ТЕСТА

- Ломающиеся стрипы позволяют эффективно использовать тест.
- Высокие чувствительность и специфичность

СОСТАВ НАБОРА

КАТ. № 362

1. **Микропланшета:** 12 X 8 лунок, (с рамкой и влагопоглотителем, в вакуумнозаклеенном алюминизированном пакете), ломающиеся, U-образной формы, покрыты специфичным антигеном *M. Pneumoniae* и FCS, готова к использованию.
2. **Отрицательный контроль:** 1 флакон 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 1,5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, окрашен в синий цвет, содержит NBCS, фенол, ПроКлин™ 300 и гентамицина сульфат.
4. **Промывающий буфер:** 1 флакон, 100 мл, PBS/Tween (10X), pH 7,2 - 7,4, содержит ПроКлин™ 300.
5. **Разбавитель образцов:** 1 флакон, 110 мл, PBS/Tween/ NBCS, pH 7,0 – 7,2, готов к использованию, окрашен в синий цвет, содержит ПроКлин™ 300.
6. **Конъюгат:** 3 флакона по 4,5 мл в каждом, козы анти-человеческие IgM, конъюгированный пероксидазой, готов к использованию, окрашен в зеленый цвет, содержит BSA, фенол, ПроКлин™ 300 и гентамицина сульфат.
7. **ТМБ-субстрат:** 1 флакон, 10 мл, готов к использованию.
8. **Стоп-раствор:** 2 флакона по 11 мл в каждом, готов к использованию.
9. **IgG/Абсорбент Ревматоидного фактора:** 1 флакон, 4 мл, козы анти-человеческие IgG антитела, готов к использованию, содержит < 0,1% азида натрия.

1. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

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

- 2.1. Вода для инъекций. Использование денонзированной 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 (мультистепер или ИФА вошер).
- 2.5. Инкубатор на 37° С.
- 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.

Расчитайте 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° С) и/или при встряхивании при комнатной температуре.
Не смешивайте специфичные реагенты (микрочипы, контроли, конъюгат) из различных лотов. В то же время разбавитель образцов, промывающий буфер, ТМБ-субстрат, IgG/РФ- абсорбент и стоп-раствор могут использоваться взаимнообразно 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. Во избежание взаимодействия с высоким титром IgG и Ревматоидным Фактором (РФ) необходимо произвести абсорбцию IgG и ревматоидного фактора.
- 4.3. Специальная подготовка сыворотки (т.е. инактивация) не требуется. Однако сыворотка не должна быть контаминирована микроорганизмами и содержать эритроциты.

5. ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

5.А. IgG/ РФ-абсорбция

Внимание:

- Контроли готовы к использованию.
- Нижеследующие объемы рассчитаны на одно определение!

- 5.А.1. Сыворотка: 10 мкл сыворотки необходимо развести в 490 мкл разбавителя образцов (разведение в соотношении 1:50).
- 5.А.2. Абсорбция: 30 мкл IgG /РФ абсорбента и 30 мкл разведенной сыворотки смешиваются (разведение 1:100) и инкубируются в течение 15 минут при комнатной температуре. Как альтернатива: абсорбция может проходить всю ночь при температуре 2 - 8° С.
- 5.А.3. Теперь тестовое разведение равно 1:100.

5.Б. ПОСТАНОВКА ТЕСТА

- 5.Б.1. Вскройте алюминиевый пакет выше «застежки», и достаньте необходимое количество микролунок (см. 3.1.).

Микролунок готовы к использованию и не нуждаются в предварительном промывании.

- 5.Б.2. Раскапайте 50 мкл разбавителя образцов в лунку А1 как бланк (см. 6.А.).
Раскапайте по 50 мкл отрицательного контроля (в дубле), положительного контроля и разведенных образцов.
Если необходимо, микролунок можно выдержать во влажной камере до 30 минут при комнатной температуре перед продолжением процедуры теста.
- 5.Б.3. Инкубируйте микролунок 60 минут (± 5 минут) при температуре 37° С ($\pm 1^\circ$ С) во влажной камере или заклеенными инкубационной пленкой.
- 5.Б.4. После инкубации промойте микролунок 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.Б.5. Раскапайте конъюгат (окрашен в красный 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.Б.6. Инкубируйте микролунок 60 минут (± 5 минут) при температуре 37° С ($\pm 1^\circ$ С) во влажной камере или заклеенными инкубационной пленкой.
- 5.Б.7. После инкубации промойте лунки снова (см. 5.Б.4.).
- 5.Б.8. Раскапайте по 50 мкл ТМБ - субстрата в каждую лунку и инкубируйте в течение 30 минут (± 2 минуты) при температуре 37° С ($\pm 1^\circ$ С) во влажной камере или заклеенными инкубационной пленкой в темноте.
Положительные образцы окрасятся в синий (голубой) цвет.
- 5.Б.9. Реакция останавливается добавлением 100 мкл стоп - раствора в каждую лунку. Положительные образцы окрасятся в желтый цвет.

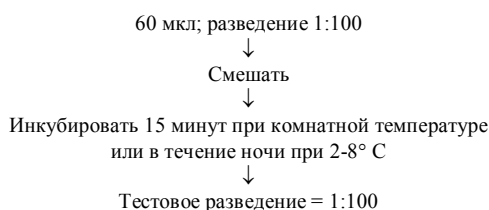
Перед фотометрическим считыванием протрите наружную поверхность лунок и убедитесь в отсутствии пузырьков воздуха в лунках.

Фотометрическое считывание производится в течение 15 минут после добавления стоп - раствора!

5.С. ТАБЛИЦА IgG/РФ- АБСОРБЦИИ

Расчитана на одно определение.

10 мкл сыворотки
+
490 мкл разбавителя образцов
500 мкл; разведение 1:50
↓
30 мкл IgG/РФ – абсорбента
+
30 мкл разведенной сыворотки



5.В. ТАБЛИЦА РАБОЧЕЙ ПРОЦЕДУРЫ ТЕСТА

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

*) ручная/автоматическая процедура теста (см. 5.Б.5.)

6.А. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ (ВАЛИДНОСТЬ)

- Считывание значений Оптической Плотности (ОП) производится при длине волны 450 нм (референс 620 – 650 нм).
- Вычтите значение ОП бланка (лунка А1) из всех других значений ОП.
 - Значение ОП бланка должно быть < 0,100
 - Значение ОП Отрицательного контроля должно быть < 0,100
 - Значение ОП Положительного контроля должно быть > 0,800

Cut-off = среднее значение ОП отрицательного контроля + 0,380

Серая зона = Cut-off ±10%

6.Б. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

6.Б.1. КАЧЕСТВЕННАЯ

Результат	Оценка
ОП < Серой зоны	Отрицательный
ОП Cut-off +/- 10%	Сомнительный
ОП > Серой зоны	Положительный

6.Б.2. ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННАЯ

Индекс Cut-off : ОП образца ОП Cut-off	Оценка
< 0,9	Отрицательный
0,9 – 1,1	Сомнительный
>1,1	Положительный

6.В. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ / ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- 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.
- 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.С. 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. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Группы пациентов	Специфичность IgM
<i>M. pneumoniae</i> IgM отрицательные сыворотки (референс- ИФА/Агглютинация)	100% (n = 40)
Группы пациентов	Чувствительность IgA
Сыворотки с IgM антителами к <i>M. pneumoniae</i> (референс- ИФА/Агглютинация) Пациенты с респираторными инфекционными заболеваниями	71% (n = 44)

7.B. ТОЧНОСТЬ

Образец	Внутритестовые отклонения				Образец	Внетестовые отклонения (n = 13)		
	Средн. Значен. UE	CO	KB (%)	n		Средн. Значен. UE	CO	KB (%)
OK	0,028	0,008	29	22	OK	0,017	0,004	24
СПК	0,838	0,019	2	22	СПК	0,792	0,050	6
ПК	1,141	0,020	2	22	ПК	0,990	0,035	4
№ 1	0,033	0,004	12	22	№ 1	0,021	0,004	19
№ 2	0,651	0,015	2	22	№ 2	0,542	0,017	3
№ 3	1,611	0,033	2	22	№ 3	1,480	0,062	4
					№ 4	1,409	0,093	7

ПК- положительный контроль,
СПК – слабо положительный контроль (не входит в состав набора),
CO- стандартные отклонения,
KB (%) - коэффициент вариальности

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.