

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ТЕСТ-НАБОРА

Mycoplasma pneumoniae – IgG- ELISA medac

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

Кат. № 360

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 «хозяинской» 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 менингитам. 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* -IgG- 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* -IgG- ИФА medac**
Кат. № 360 для 96 определений,

Мы предлагаем также: ***Mycoplasma pneumoniae* -IgA- ИФА medac**
Кат. № 361 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 IgG антитела связываются с IgG антителами.

Инкубация с ТМБ-субстратом. Реакция останавливается добавлением стоп 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. № 360

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 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. **Калибратор:** 1 флакон 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, козы анти-человеческие IgG, конъюгированный пероксидазой, готов к использованию, окрашен в зеленый 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° 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

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 (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. 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° С) 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 использоваться 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.).

Микролунок 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, микролунок можно выдержать во влажной камере до 30 минут при комнатной температуре перед продолжением процедуры теста.

- 5.3. Инкубируйте микролунок 60 минут (± 5 минут) при температуре 37° С ($\pm 1^\circ$ С) во влажной камере или заклеенными инкубационной пленкой.

5.4. 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!

- 5.5. 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 микролунок 60 минут (± 5 минут) при температуре 37° С ($\pm 1^\circ$ С) во влажной камере или заклеенными 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° С ($\pm 1^\circ$ С) 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	50 мкл	--	--	--	--
Отр. Контроль	--	50 мкл	--	--	--
Пол. Контроль	--	--	50 мкл	--	--
Калибратор	--	--	--	50 мкл	--
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*	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	50 мкл
Инкубировать 30 мин. при 37° С, 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).
- Вычитите значение ОП бланка (лунка А1) из всех других значений ОП.
- Лот-специфичные данные

К набору прилагается лист с лот-специфичными данными, содержащий следующую информацию:

- Лот-специфичная калибровочная кривая
- Значения а 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:

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

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 свежеснятым 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. Пропешедшая 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. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Группы пациентов	Специфичность IgG
<i>M. pneumoniae</i> IgG отрицательные сыворотки (референс- ИФА/Агглютинация)	80% (n = 40)
Группы пациентов	Чувствительность IgG
Сыворотки с IgG антителами к <i>M. pneumoniae</i> (референс- ИФА/Агглютинация) Пациенты с респираторными инфекционными заболеваниями	84% (n = 45)

7.B. ТОЧНОСТЬ

Образец	Внутригрупповые отклонения				Образец	Внегрупповые отклонения			
	Средн. Значен. УЕ	СО	КВ (%)	n		Средн. Значен. УЕ	СО	КВ (%)	n
ПК	22,1	2,1	10	22	ПК	23,2	1,4	6	13
№ 1	15,9	0,6	4	22	№ 4	33,7	1,6	5	13
№ 2	35	1	3	22	№ 5	68,7	3,7	5	13
№ 3	88,3	4,3	5	22	№ 6	99	6,3	6	13

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