

**VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgG/IgM ELISA
(M. pneumoniae IgG/IgM ELISA)**

Rendelési szám: EC114.00

M. pneumoniae IgA-Set

Rendelési szám: EC114.08

Színkód: sötétkék

CSAK *IN VITRO* DIAGNOSZTIKAI CÉLOKRA

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Tartalom

1. Alkalmazás célja.....	3
2. A teszt működési elve	3
3. A készlet tartalma.....	3
3.1 IgG / IgM teszt készlet.....	3
3.2 IgA szett.....	3
4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága	3
5. Óvintézkedések és biztonsági előírások	4
6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)	4
7. A vizsgálat elvégzése	4
7.1 Vizsgálati anyag.....	4
7.2 A reagensek előkészítése	4
7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése.....	5
7.4 ELISA-processzor alkalmazása.....	5
8. A vizsgálati eredmények kiértékelése.....	5
8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése.....	5
8.2 A VIROTECH egységek (VE) számítása.....	6
8.3 A betegminták kiértékelése	6
8.4 Interpretációs séma.....	7
8.5 A teszt határai	7
9. Irodalom	7
10. A vizsgálat folyamatábrája vázlata.....	9

1. Alkalmazás célja

A *Mycoplasma pneumoniae* ELISA a humán szérumban jelenlevő IgG-, IgM- és IgA-antitestek kvantitatív és szemikvantitatív kimutatására szolgál. Az IgG-antitest kimutatása úgy van beállítva, hogy az mindenekelőtt friss fertőzéseket észleljen.

2. A teszt működési elve

A humán szérumból kimutatandó antitest immunkomplexet alkot a mikrotiter lemezre rögzített antigénnel. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás eltávolítja. Az említett immunkomplexhez kötődik az enzimkonjugátum. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás ismét eltávolítja. A szubsztrátoldat (TMB) hozzáadása után az enzim (peroxidáz) aktivitása egy kék színyanyagot képez, mely a fixáló (stop) oldat hozzáadása után sárga színűre változik.

3. A készlet tartalma

3.1 IgG / IgM teszt készlet

1. **1 Mikrotiter lemez**, mely 96, antigénnel bevont, egyesével letörhető lyukból (reakcióedényből) áll (líoifilizált).
2. **PBS hígítópuffer (kék, felhasználásra kész) 2x50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
3. **PBS mosóoldat (20x koncentrált) 50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
4. **IgG negatív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
5. **IgG kimutatási határérték (cut-off) kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
6. **IgG pozitív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
7. **IgM negatív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
8. **IgM kimutatási határérték (cut-off) kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
9. **IgM pozitív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
10. **IgG-konjugátum (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerekkel, Tris pufferben, felhasználásra kész
11. **IgM-konjugátum (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum FCS-el és tartósítószerekkel, Tris pufferben, felhasználásra kész
12. **Tetrametil-benzidin – szubsztrátoldat (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, felhasználásra kész
13. **Citrát fixáló (stop) oldat, 6 ml**, savkeveréket tartalmaz

3.2 IgA szett

1. **IgA negatív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
2. **IgA kimutatási határérték (cut-off) kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
3. **IgA pozitív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
4. **IgA-konjugátum 2 (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum FCS-el és tartósítószerrel, Tris pufferben, felhasználásra kész

4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága

A teszt készletet 2-8°C között kell tárolni. Az egyes komponensek eltarthatósága azok címkéjén található; a kit eltarthatósága tekintetében lásd a minőségellenőrzés tanúsítványt.

1. A szükséges lyukak felhasználása után a fennmaradó lyukakat / csíkokat zárt tasakban, 2-8°C-on, nedvszívó anyaggal együtt kell tárolni. A reagenseket használat után további tárolásra azonnal 2-8°C-ra kell tenni.
2. A felhasználásra kész konjugátum és a TMB oldat fényérzékeny és így ezeket sötétben kell tárolni. Ha a szubsztrátoldatot fény éri és ennek következtében elszíneződik, a továbbiakban nem használható fel. ki kell dobni.
3. Csak az elvégzendő teszthez szükséges mennyiségű felhasználásra kész konjugátumot illetve TMB-t vegye ki az üvegekből. A feleslegben kivett konjugátumot illetve TMB-t ki kell önteni, az üvegekbe azokat visszatölteni nem szabad.

Anyag	Állapot	Tárolás	Tartósság
Vizsgálati minták	Hígított	+2 és +8°C között	max. 6 óra
	Hígítatlan	+2 és +8°C között	1 hét
Kontrollok	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mikrotiterlemez	felbontás után	+2 és +8°C között (Tárolás a mellékelt tasakban szárítószer tasakkal)	3 hónap
Reumafaktor – abszorbens	Hígítatlan, felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	Hígított	+2 és +8°C között	1 hét
Konjugátum	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Tetrametil-benzidin (TMB)	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Leállítóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mosóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	Véghígított (Használatra kész)	+2 és +25°C között	4 hét

5. Óvintézkedések és biztonsági előírások

- Kontrollszérumként csak tesztelt és HIV1-antitestekre, HIV2-antitestekre, HCV-antitestekre és Hepatitis-B felületi antigénekre negatív eredményt mutatott szérum kerül alkalmazásra. Ennek ellenére valamennyi minta, hígított minta, konjugátum és mikrotiter csík potenciálisan fertőző anyagnak tekintendő. A termékek kezelése a laboratóriumi munkára általánosan vonatkozó szabályok szerint történjen.
- A tartósítószer tartalmazó komponensek, a citrát fixáló (stop) oldat és a TMB irritálják a bőrt, a szemet és a nyálkahártyát. Az érintett testrészt folyó vízzel azonnal le kell mosni, és szükség esetén orvoshoz kell fordulni.
- A keletkezett hulladékot az érintett ország rendelkezéseinek megfelelően kell tárolni és elhelyezni.

6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)

- Desztillált / ioncserélt víz
- Nyolccsatornás pipetta, 50 µl és 100 µl
- Mikropipetták: 10 µl, 100 µl és 1000 µl
- Vegyszerüvegek
- Papírkendők és itatóspapír
- Fedő az ELISA lemezekhez
- Hulladéktároló a fertőző anyagok számára
- ELISA kézi- ill. automata mosó mikrotiter lemezekhez
- Spektrofotométer ELISA lemezekhez, hullámhossz 450 nm, referencia hullámhossz: 620 nm (referenciahullám hossza 620-690nm).
- Inkubátorszekrény

7. A vizsgálat elvégzése

Csak a VIROTECH Diagnostics által előírt módszer pontos betartásával kapunk helyes eredményeket.

7.1 Vizsgálati anyag

Vizsgálati anyagként használható szérum és plazma (itt az antikoagulálás módjának nincs jelentősége), még akkor is, ha a csomagmellékletben csak szérumról van szó.

A pácienshígításokat mindig frissen kell elkészíteni.

Hosszabb tároláshoz a szérumokat le kell fagyasztani. A többszöri felolvasztást kerülni kell.

- Csak friss, nem inaktivált szérumot szabad felhasználni.
- Hiperlipémiás, hemolitikus és mikrobiológiailag fertőzött mintákat, valamint zavaros szérumokat nem szabad felhasználni (hamis pozitív illetve negatív eredmények).

7.2 A reagensek előkészítése

A VIROTECH Diagnostics System Diagnostik nagyfokú rugalmasságot kínál azért, hogy a hígító- és mosópufferek, a TMB és a citrát fixáló (stop) oldat valamint a konjugátum különböző paraméterek mellett és eltérő gyártási tételek esetén is alkalmazhatóak. A felhasználásra kész kontrollok (pozitív kontroll, kimutatási határérték (cut-off) kontroll, negatív kontroll) paraméterfüggők és kizárólag a minőségi tanúsítványban megadott lemez charge-zsal együtt alkalmazhatók.

1. Állítsa be az inkubátorszekrény hőmérsékletét 37°C-ra és az inkubáció megkezdése előtt bizonyosodjon meg róla, hogy az elérte a beállított hőmérsékletet.
2. Minden reagenst engedjen felmelegedni szobahőmérsékletre; csak ezután nyissa fel a tesztcsíkokat tartalmazó csomagot.
3. Minden folyékony komponenst jól rázzon fel használat előtt.
4. A mosóoldat-koncentrátumot 1 l-re fel kell tölteni desztillált vagy demineralizált vízzel (ha a koncentrátumban esetleg kristályképződés látható, kérjük az oldatot hígítás előtt szobahőmérsékletre melegíteni, és használat előtt jól felrázni).
5. A specifikus IgM-antitestek kimutatását zavarhatja a túl magas IgG-titer illetve reumafaktorok jelenléte, hamis pozitív illetve negatív eredményekhez vezetve. A **szérumokat elő kell kezelni RF-SorboTech** (VIROTECH-adszorpciószer) készítménnyel. IgM kontrollok esetében az előabszorpció lépés kimarad.

7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése

1. Pipetázzon ki tesztenként 100 µl felhasználásra kész hígítópuffert (vak minta), negatív, határérték (cut-off) és pozitív IgG-, IgM- és IgA kontrollt, valamint a hígított betegszérumokat. Minden esetben (vak, kontrollok, betegszérumok) javasoljuk hogy két párhuzamos mérést végezzen; a határérték (cut-off) kontrollok esetében a két mérés elvégzése feltétlenül szükséges. Munkahígítás betegszérumok esetében: 1+100; pl. 10 µl szérum + 1 ml hígítópuffer.
2. A reagensek kipipetázása után 30 perc 37°C-on történő inkubáció következik (fedő alatt).
3. Az inkubációs idő lejártá után mossa ki a lyukakat 4-szer 350-400 µl mosóoldattal (lyukanként). Mosóoldatot ne hagyja lyukakban állni. Papírtörölközőre csepegtesse ki a maradék oldatot.
4. Minden lyukba pipetázzon 100 µl felhasználásra kész konjugátumot.
5. Inkubálja a konjugátumot 30 percig 37°C-on (fedő alatt).
6. A konjugátum inkubálását 4-szeri mosással állítsa le. (ld. 3.pont).
7. Pipetázzon 100 µl felhasználásra kész TMB szubsztrátoldatot minden lyukba.
8. A hordozóoldat inkubációja: 30 perc 37°C-on (lefedve, sötét helyen).
9. Minden lyukba pipetázzon 50 µl citrát fixáló (stop) oldatot, így leállítva a szubsztrátreakciót. Óvatosan kevertesse a lemezt, amíg a folyadékok teljesen összekeverednek és egy egységes sárga szín láthatóvá válik.
10. Mérjen extinkciót 450/620 nm-en (referenciahullám hossza 620-690nm). Állítsa úgy be a fotométert, hogy a mért vak érték a többi extinkciós értékből levonásra kerüljön (nullázza a fotométert az üres értékre). A fotometriás mérést a fixáló (stop) oldat hozzáadása után egy órán belül el kell végezni.

A vizsgálat folyamatábráját ld. az utolsó oldalon

7.4 ELISA-processzor alkalmazása

Valamennyi VIROTECH Diagnostics ELISA termék alkalmas ELISA processzorokkal való használatra. A felhasználó köteles a műszer érvényesítését rendszeresen elvégeztetni.

A VIROTECH Diagnostics a következő eljárást javasolja:

1. Az ELISA processzor üzembehelyezése ill. nagyobb javítása esetén javasoljuk, hogy végeztesse el a készülék hitelesítését a gyártó előírásai szerint.
2. Javasoljuk, hogy az ELISA processzort ellenőrizze a hitelesítő kit (EC250.00) segítségével is. A hitelesítő kittel történő ellenőrzést legalább negyedévenként ajánlott elvégezni.
3. Minden mérési sorozat során meg kell felelni a termék minőségi tanúsítványában szereplő minőségellenőrzési kritériumoknak.

Ez az eljárásmód biztosítja az ELISA processzor kifogástalan működését, és ezen túl a labor minőségbiztosítását is szolgálja.

8. A vizsgálati eredmények kiértékelése

A felhasználásra kész kontrollok a specifikus IgG-, IgA- és IgM-antitestek koncentrációjának VIROTECH egységekben (=VE) történő szemikvantitatív meghatározására szolgálnak. A teszt végrehajtása során előforduló ingadozásokat a számítási módszer kiegyenlíti, ezáltal nagyfokú reprodukálhatóságot érve el. A VE kiszámításához az OD-értékek átlagát kell használni.

8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése

a) OD-értékek

Az üres minta OD-értéke <0,15 kell, hogy legyen.

A negatív kontrollok OD-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott OD-értékek alatt, míg a pozitív kontrollok és a cut-off kontrollok OD-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott OD-értékek felett kell lenniük.

b) VIROTECH egységek (VE)

A cut-off kontrollok VIROTECH egységekben (VE) megadott értéke 10 VE-ben van meghatározva. A pozitív kontrollok VE-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott értéktartományon belül kell lenniük.

Amennyiben a fenti feltételek (OD-értékek, VE értékek) nem teljesülnek, a tesztet meg kell ismételni.

8.2 A VIROTECH egységek (VE) számítása

A vak minta extinkcióját (450/620 nm) minden extinkcióból ki kell vonni.

$$VE_{\text{(pozitív kontrollok)}} = \frac{OD_{\text{(pozitív kontroll)}}}{OD_{\text{(cut-off kontroll)}}} \times 10$$

$$VE_{\text{(betegszérum)}} = \frac{OD_{\text{(betegszérum)}}}{OD_{\text{(cut-off kontroll)}}} \times 10$$

8.3 A betegminták kiértékelése

- a) IgM és IgA esetén minden betegre, IgG esetén csak 14 évesnél idősebb betegek

Eredmény (VE) (IgG > 14 év, IgM és IgA)	Kiértékelés
< 9,0	negatív
9,0 - 11,0	kétséges diagnózis
> 11,0	pozitív

- b) IgG esetén, gyerekekre (0-14 év) vonatkozóan, ha IgM és/vagy IgA pozitív
0 és 14 év közötti gyerekeknél a határértéktartomány (határérték) IgG-ben lefelé tolódhat, mivel a VIROTECH ELISA IgG-ben úgy van beállítva, hogy főleg az akut fertőzéseket észlelje. Ezen sémák alkalmazásának az a feltétele azonban, hogy a szérum pozitív IgM- és /vagy IgA-eredményt adjon.

Eredmény (VE) (IgG 0-14 éves)	Kiértékelés
< 7,0	negatív
7,0 - 8,0	határérték
> 8,0	pozitív

- Amennyiben a minta mért VE értéke a határérték felett van, a mintát pozitívnak kell tekinteni.
- A fertőzés biztos kimutatásához két szérummintából szükséges az antitestet kimutatni. Egy szérummintát közvetlenül a fertőzés kezdete után, egyet pedig 5-10 nappal később (rekonvaleszcens szérum) kell tesztelni. Az antitest-koncentrációt párhuzamosan, egyetlen teszt mérés során kell meghatározni mindkét mintából. Egyetlen szérumminta eredményei alapján korrekt diagnózis nem állítható fel. A legnagyobb érzékenység akkor érhető el, ha mindhárom antitestoszályban (IgG, IgM, IgA) mérünk, figyelembe véve, hogy vannak egyének, akik nem termelnek IgM antitesteket.
- Ha a mért értékek a meghatározott határérték alá esnek, a mintából nem mutatható ki antigénspecifikus antitest. A mintát negatívnak kell tekinteni.

8.4 Interpretációs séma

IgG	IgA	IgM	Interpretáció
-	-	-	A beteg nem került kontaktusba <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -val, vagy az anitest-szint már a kimutatási határérték alá csökkent
-	+	+	Akut vagy a közelmúltban lezajlott fertőzés igen korai fázisa
-	+	-	Akut fertőzés egészen korai fázisa; vagy IgM nélküli első fertőzés illetve újrafertőzés, vagy az IgM titer még csak most kezd emelkedni
+	+	+	Akut fertőzés, első fertőzés, általában késői fázis, IgG és IgM már képződött, IgA szint még nem csökkent le
+	-	+	Akut fertőzés, első fertőzés, általában késői fázis, IgG és IgM már képződött, IgA szint már lecsökkent
+	+	-	Újrafertőzés, nagyon késői fázis, IgA még kimutatható, IgM nem mutatható már ki; vagy újraaktiválás, vagy IgM képzés nélküli fertőzés
+	-	-	Újrafertőzés, nagyon késői fázis, IgA már lecsökkent illetve egyáltalán nem képződött, vagy újraaktiválás, vagy IgM képzés nélküli fertőzés vagy perzisztens IgG titer egy átfutó fertőzés után
-	-	+	Akut korai fertőzés, IgA még nem mutatható ki vagy már lecsökkent, IgG még túl alacsony titerben .

Fontos figyelmeztetés: Elszigetelten előforduló, tévesen pozitív IgA- vagy IgM-eredményeket soha nem lehet 100%-os biztonsággal kizárni. Megerősítésként ajánlott az IgG-titer ellenőrzése 5-10 napon belül, vagy pedig az ellenőrzés Immunoblot (LINE) módszerrel.

8.5 A teszt határai

1. A szerológiai eredmények interpretációja során mindig figyelembe kell venni a klinikai összképet, az epidemiológiai adatokat valamint az esetlegesen rendelkezésre álló további laboratóriumi leleteket.
2. Egy *Mycoplasma*-fertőzést az anamnézisleltétel és klinikai vizsgálat (ideértve a standard laboratóriumi vizsgálatot és a röntgenellenőrzést) ellenére is nehéz a felső és alsó légutak más fertőzéseitől, illetve az atipikus tüdőgyulladástól megkülönböztetni. Nem világos esetekben vagy tovább fennálló tüneteknél, negatív lelet esetén javasoljuk a diagnózist szerológia mellett molekuláris biológiai kimutatási eljárással alátámasztani.
3. Keresztreakciók nem zárhatóak ki a *M.genitalium* és *M.hominis* esetében. EBV-pozitív szérumok is adhatnak keresztreakciót.

9. Irodalom

1. Clyde WA.J.: Clinical overview of typical *Mycoplasma pneumoniae* infections. J. Clin Infect. Dis. 1993, 17 (suppl. 1) 32-37
2. Hu, P.-C., Collier, A.M. and Baseman, J.B. (1977): Surface parasitism by *Mycoplasma pneumoniae* of respiratory epithelium. J. of Experimental med. 145, 1328-13343.
3. Razin, S. (1992): Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. FEMS Microbiol. Lett. 100, 423-432.
4. Taylor-Robinson, D. (1996): Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. Clin. Infect. Dis. 23, 671-684.
5. Jacobs, E.: Mycoplasmen-Infektionen. mta. 1997, 12: 236-239
6. Jacobs, E.: Das Adhäsion von *Mycoplasma pneumoniae*: Seine Bedeutung als Virulenzfaktor in der Pathogenese und in der Diagnostik. Klin. Lab. 1994: 40: 228-229
7. Dumke, R., A. Strubel, C. Cyncynatus, H. Nuytens, R. Herrmann, C. Lück, and E. Jacobs. 2012. Optimized serodiagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. Diagnostic microbiology and infectious disease. Elsevier Inc. 73:200-203.

8. Foy, HM: Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. J Clin Infect Dis 1993, 17(suppl. 1) 37-47.
9. Baum, H. v. et.al.: *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia revisited within the German Competence Network for Community-acquired pneumonia (CAPNETZ), BMC Infectious Diseases 2009, 9:62

A betegminták és a mosóoldat előkészítése

▼ **Mosóoldat:** A koncentrátumot hígítsa fel 1 literre desztillált vagy ioncserélt vízzel.

▼ **IgG-/IgA- minták – hígítás**
1:101

pl.:
10 µl szérum/plazma + 1000 µl hígítópuffer.
(a szérum hígítópuffer felhasználásra kész)

▼ **IgM- minták – hígítás**
1:101

Reumafaktor-abszorpció RF-SorboTech-hel

pl.:
5 µl szérum/plazma + 450 µl hígítópuffer +
1 csepp RF-SorboTech, 15 perc inkubáció
szobahőmérsékleten

A vizsgálat elvégzése

Mintainkubáció

30 perc 37°C-on

100 µl betegszérum

Üres minta (hígítópuffer) és kontrollok

4x mosás

400 µl mosóoldat

jól kiütögetni

Konjugátum inkubáció

30 perc 37°C-on

100 µl konjugátum

IgG, IgM, IgA

4x mosás

400 µl mosóoldat

jól kiütögetni

Szubsztrátinkubáció

30 perc 37°C-on

100 µl szubsztrát

Leállítás

50 µl fixáló (stop) oldat

óvatosan kevertetni

Extinkció mérés

Fotométer 450/620 nm-en
(referenciahullám hossza 620-690nm)