

VIROTECH Mycoplasma pneumoniae polyvalent IgG/IgA+IgM ELISA
(M. pneumoniae polyv. IgG/IgA+IgM ELISA)

Nr zamówienia: Bestell-Nr.: EC214.00

Kod barwny: ciemnoniebieski

TYLKO DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim

Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>



Treść

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. Zawartość opakowania.....	3
3.1 Zestaw testowy IgG, IgA+M	3
4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników	3
5. Środki ostrożności i ostrzeżenia	4
6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)	4
7. Wykonanie badania.....	4
7.1 Materiał do badań	4
7.2 Przygotowanie odczynników	4
7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA.....	5
7.4 Zastosowanie aparatury ELISA.....	5
8. Ocena wyników badania	5
8.1 Kontrola badania.....	6
8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE).....	6
8.3 Ocena wyników.....	6
8.4 Schemat interpretacji	7
8.5 Ograniczenia testu	7
9. Literatura.....	8
10. Schemat przebiegu badania	9

1. Cel zastosowania

Test Mycoplasma pn. polyvalent ELISA służy do półilościowego i ilościowego oznaczenia przeciwciał IgG oraz wspólnego oznaczenia przeciwciał IgA i IgM w surowicy ludzkiej. Oznaczenie przeciwciał IgG jest tak ustawione, że wykrywane są przede wszystkim świeże zakażenia. W celu łatwiejszej i skuteczniejszej diagnostyki przeciwciała IgA i IgM są oznaczane razem z poliwalentnym mieszanym koniugatem IgA+IgM.

2. Zasada badania

Znakowane w surowicy ludzkiej przeciwciała tworzy razem z umieszczonym na mikropłytkę antygenem kompleks immunologiczny. Niezwiązane immunoglobuliny są usuwane w procesach płukania. Z kompleksem tym łączy się koniugat enzymu. Niezwiązane immunoglobuliny są następnie usuwane w procesach płukania. Po dodaniu roztworu substratu (TMB) w wyniku aktywności enzymów (peroksydazy) powstaje niebieski barwnik, który po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję zabarwia się na żółto.

3. Zawartość opakowania

3.1 Zestaw testowy IgG, IgA+M

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 łamliwych dołków opłaszczonych antygenami, liofilizowane
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia) 2x50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **roztwór do płukania PBS (20x stężony) 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
4. **IgG kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
5. **IgG kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
6. **IgG kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
7. **IgA+M kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
8. **IgA+M kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
9. **IgA+M kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
10. **koniugat IgG (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzanowej ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi i w buforze Tris, gotowy do użycia
11. **koniugat IgA+M (mieszanina antyludzkich IgA+IgM), 11 ml**, koniugat znakowany (owczą lub kozią) peroksydazą chrzanową ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi w buforze Tris, gotowy do użycia
12. **tetrametylobenzzydina – roztwór substratu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, gotowy do użycia roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml, zawiera mieszaninę kwasów

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

1. Po pobraniu wymaganych pojedynczych dołków pozostałe pojedyncze dołki/paski przechowywać w zamkniętym woreczku z osuszaczami w temperaturze 2-8°C. Odczynniki natychmiast po użyciu przechowywać ponownie w temperaturze 2-8°C.
2. Gotowy do użycia koniugat oraz roztwór substratu TMB są wrażliwe na światło i muszą być przechowywane w ciemności. Jeżeli po dostaniu się światła dojdzie do przebarwienia roztworu substratu, należy go wyrzucić.
3. Wyjąć tylko potrzebną do testu ilość gotowego do użycia koniugatu lub TMB. Nadmiar wyjętego koniugatu lub TMB nie może być z powrotem odłożony, lecz należy go usunąć.

Material	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Próbki	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	max. 6 h
	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Kontrole	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące

Płytki mikrotitracyjna	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w dostarczonej torebce z osuszaczem)	3 miesiące
Absorbent czynnika reumatoidalnego	bez rozcieńczenia, po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	1 tydzień
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzodyna (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Roztwór zatrzymujący reakcje	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór do płukania	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +25°C	4 tygodnie

5. Środki ostrożności i ostrzeżenia

1. Jako surowice kontrolne stosowane są tylko te surowice, które były przebadane i uzyskały wynik negatywny na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Wszystkie próbki, rozcieńczone próbki, kontrole, koniugaty i mikropaski do miareczkowania należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązują odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
2. Komponenty zawierające środki konserwujące, roztwór zatrzymujący reakcję na bazie cytrynianu i TMB podrażniają skórę, oczy i błony śluzowe. W przypadku kontaktu należy natychmiast przemyć dane miejsca ciała bieżącą wodą i ewentualnie pójść do lekarza.
3. Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.

6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)

1. woda destylowana/demin.
2. pipety wielokanałowe 50µl, 100µl
3. mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. probówki
5. chusty z masy celulozowej
6. przykrywa płytek ELISA
7. pojemnik do usuwania materiałów zakaźnych
8. ręczna płuczka ELISA lub automatyczna płuczka mikropłytek
9. spektrofotometr do odczytu mikropłytek z filtrem 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm)
10. inkubator
11. RF-Sorbotech do testu VIROTECH IgA+M ELISA z mieszanym koniugatem antyludzkich IgA+IgM (patrz Przygotowanie odczynników)

7. Wykonanie badania

Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.

7.1 Materiał do badań

Jako materiał badawczy można zastosować surowicę i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantów), nawet jeśli w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

Rozcieńczone próbki od pacjentów muszą być zawsze świeże podczas zastosowania.

W celu dłuższego przechowywania surowice muszą być zamrożone. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania.

1. Stosować tylko świeże, niedezaktywowane surowice.
2. Nie stosować próbek hiperlipemicznych, hemolitycznych, mikrobiologicznie zanieczyszczonych oraz mętnych surowic (fałszywie pozytywne/negatywne wyniki).

7.2 Przygotowanie odczynników

Diagnostyka Systemowa VIROTECH Diagnostics oferuje duży stopień elastyczności poprzez możliwość zastosowania buforu do rozcieńczania i płukania, TMB, roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu oraz koniugatu niezależnie od parametrów i serii. Gotowe do użycia kontrole (kontrola pozytywna, kontrola cut-off, kontrola negatywna) należy stosować swoiście dla parametrów i wyłącznie z serią płytek podaną w certyfikacie kontroli jakościowej.

1. Ustawić inkubator na temperaturę 37°C i przed rozpoczęciem inkubacji sprawdzić, czy osiągnięto daną temperaturę.
2. Wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzyć opakowanie z paskami testowymi.
3. Wszystkie płynne komponenty należy dobrze wymieszać przed użyciem.
4. Koncentrat roztworu do płukania dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demineralizowaną (w przypadku ewentualnej krystalizacji koncentratu należy przed rozcieńczeniem doprowadzić go do temperatury pokojowej i przed użyciem dobrze wstrząsnąć).
5. Wysokie miana IgG lub czynniki reumatoidalne (RF) mogą zaburzyć swoiste oznaczenie przeciwciał IgM oraz prowadzić do fałszywie pozytywnych lub fałszywie negatywnych wyników. **W celu prawidłowego wspólnego oznaczenia przeciwciał IgA i IgM mieszanym koniugatem IgA+IgM konieczne jest w związku z tym wstępne potraktowanie surowic odczynnikiem RF-SorboTech (adsorbentem firmy VIROTECH).** W kontrolach IgA+M nie ma wstępnej adsorpcji.

7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA

1. Na jedną próbę odpipetować po 100µl gotowego do użycia buforu do rozcieńczania (ślepa próba), negatywnej, cut-off i pozytywnej kontroli IgG, IgA+M oraz rozcieńczonych surowic pacjentów. Zalecamy za każdym razem podwójne oznaczenie (ślepa próba, kontrole i surowice pacjentów), w kontroli cut-off podwójne oznaczenie jest obowiązkowo konieczne. Rozcieńczenie robocze surowic pacjentów: 1+100; np. 10µl surowicy + 1ml buforu do rozcieńczania.
2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez 30 min w temperaturze 37 °C (z przykryciem).
3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez 4-krotne płukanie, każdorazowo 350-400 µl roztworu do płukania na dołek. Nie pozostawiać roztworu do płukania w dołkach, lecz usunąć pozostałości płynu poprzez wystukanie na podłoże z waty celulozowej.
4. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia koniugatu do wszystkich dołków.
5. Inkubacja z koniugatem: 30 min. w temperaturze 37°C (z przykryciem).
6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez 4-krotne płukanie (patrz pkt 3).
7. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia roztworu substratu TMB do każdego dołka.
8. Inkubacja roztworu substratu: 30 min w temperaturze 37°C (z przykryciem, w ciemności).
9. Zatrzymanie reakcji substratu: do wszystkich dołków dodać pipetami po 50µl roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu. Ostrożnie i dokładnie wstrząsnąć płytką, aż płyny całkowicie się wymieszają i widoczny będzie jednorodnie żółty kolor.
10. Dokonać pomiaru ekstynkcji przy 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm). Ustawić tak fotometr, żeby zmierzona ślepa próba była odliczona od wszystkich pozostałych ekstynkcji. Pomiar fotometryczny powinien być przeprowadzony w ciągu godziny po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Schemat przebiegu badania patrz ostatnia strona

7.4 Zastosowanie aparatury ELISA

Wszystkie testy VIROTECH Diagnostics ELISA mogą być przetwarzane za pomocą aparatów ELISA. Użytkownik jest zobowiązany do regularnego przeprowadzania walidacji urządzeń.

VIROTECH Diagnostics zaleca następujące postępowanie:

1. Przy nastawianiu urządzenia lub większych naprawach aparatów ELISA firma VIROTECH Diagnostics zaleca przeprowadzenie walidacji urządzenia zgodnie z wytycznymi producenta urządzenia.
2. Zaleca się następnie sprawdzenie aparatu ELISA za pomocą zestawu do walidacji (EC250.00). Regularne sprawdzanie zestawem do walidacji powinno być przeprowadzane przynajmniej raz na kwartał.
3. Podczas każdego testu muszą być spełnione zezwalające kryteria zawarte w certyfikacie kontroli jakości produktu. Takie postępowanie gwarantuje nienagane działanie aparatu ELISA i służy ponadto do zapewnienia jakości pracy laboratorium.

8. Ocena wyników badania

Gotowe do użycia kontrole służą do ilościowego oznakowania specyficznych przeciwciał IgG, IgA i IgM, których stężenie jest podawane w Jednostkach VIROTECH (=VE). Odchylenia uwarunkowane przeprowadzeniem badania są wyrównywane

metodą obliczeniową i dzięki temu osiągana jest duża odtwarzalność. W celu obliczenia VE stosowane są średnie wartości OD.

8.1 Kontrola badania

a) wartości OD (gęstości optycznej)

Wartość OD ślepej próby powinna wynosić <0,15.

Wartości OD kontroli negatywnej powinny być mniejsze od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości, a wartości OD kontroli pozytywnej powinny być większe od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości.

b) Jednostki VIROTECH (VE)

Jednostki VIROTECH (VE) kontroli cut-off są zdefiniowane jako 10 VE. Obliczone VE kontroli pozytywnych powinny znajdować się w przedziale podanym w certyfikacie kontroli jakości.

Jeżeli wymagania (wartości OD, VE) nie są spełnione, należy powtórzyć test.

8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)

Ekstynkcja próby ślepej (450/620nm) musi być odliczona od wszystkich ekstynkcji.

$$VE_{\text{(kontrola pozytywna)}} = \frac{OD_{\text{(kontrola pozytywna)}}}{OD_{\text{(kontrola cut-off)}}} \times 10$$
$$VE_{\text{(surowica pacjenta)}} = \frac{OD_{\text{(surowica pacjenta)}}}{OD_{\text{(kontrola cut-off)}}} \times 10$$

8.3 Ocena wyników

a) W IgA+M dla wszystkich pacjentów, w IgG dla pacjentów >14 lat

Wynik (VE) (IgG > 14 lat, IgA+M)	Ocena
< 9,0	negatywne
9,0 - 11,0	wartości graniczne
> 11,0	pozytywne

b) W IgG dla dzieci (0 -14 lat), jeśli IgA+M pozytywne

U dzieci w wieku od 0 do 14 lat zakres wartości granicznych (cut-off) w IgG może być obniżony, ponieważ test VIROTECH ELISA jest tak ustawiony w IgG, że wykrywane są w przeważającym stopniu ostre zakażenia. Warunkiem zastosowania tego schematu jest jednak, że dla surowicy uzyskano pozytywny wynik IgA+M.

Wynik (VE) (IgG 0 -14 lat)	Ocena
< 7,0	negatywne
7,0 - 8,0	wartości graniczne
> 8,0	pozytywne

1. Jeżeli zmierzone jednostki VE próbki są wyższe od zakresu granicznego, to próbki te są traktowane jako pozytywne.
2. W celu pewnego stwierdzenia zakażenia konieczne jest oznaczenie zawartości przeciwciał dwóch próbek surowicy. Jedna próbka surowicy powinna być zbadana bezpośrednio na początku zakażenia, a druga próbka po 5 -10 dniach (surowica rekonwalescencyjna). Stężenie przeciwciał obydwóch próbek musi być oznaczane równolegle, to znaczy w jednym badaniu. Nie jest możliwa prawidłowa diagnoza na podstawie oceny pojedynczej próbki surowicy. Ponieważ niektóre osoby nie wytwarzają IgM i z reguły nie są badane wszystkie 3 klasy przeciwciał (IgG, IgM i IgA), dzięki wspólnemu oznaczeniu IgG oraz IgA+M uzyskuje się duży stopień czułości diagnostycznej.
3. Jeżeli zmierzone wartości są niższe od zdefiniowanej szarej strefy, w próbce nie występują dające się zmierzyć specyficzne dla antygenów przeciwciała. Probki są traktowane jako negatywne.

8.4 Schemat interpretacji

IgG	IgA+M	Interpretacja
-	-	- Brak podwyższonego miana przeciwciał przeciw <i>M. pneumoniae</i>. - Brak podejrzenia zakażenia <i>M. pneumoniae</i>. W przypadku nadal utrzymujących się objawach klinicznych zażądać kontroli przebiegu lub wyjaśnić w diagnostyce różnicowej.
-	+	- Podwyższone miano przeciwciał przeciw <i>M. pneumoniae</i> w IgA i/lub IgM. - Podejrzenie wczesnej fazy ostrego zakażenia <i>M. pneumoniae</i>. Nie należy nigdy w 100% wykluczać odosobnionych fałszywie pozytywnych wyników IgA lub IgM, które mogą tu wspólnie znajdować zastosowanie. W celu potwierdzenia zalecane jest sprawdzenie miana IgG po 5 -10 dniach lub sprawdzanie przy użyciu testu immunoblot (LINE).
+	+	- Podwyższone miano przeciwciał przeciw <i>M. pneumoniae</i>. - Podejrzenie ostrego zakażenia <i>M. pneumoniae</i>.
+	-	- Podejrzenie niedawno przebytego zakażenia <i>M. pneumoniae</i>, IgA+M już obniżone. - Pozostałości miana nie są do wykluczenia we wszystkich przypadkach.

8.5 Ograniczenia testu

1. Interpretacja wyników serologicznych powinna zawsze uwzględniać obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz ewentualnie dalsze będące do dyspozycji wyniki laboratoryjne.
2. Zakażenie *Mycoplasma* jest trudne do odróżnienia od innych zakażeń górnych i dolnych dróg oddechowych lub atypowych zapaleń płuc mimo wywiadu chorobowego, badania klinicznego, w tym standardowych badań laboratoryjnych i badania RTG. W niejasnych przypadkach lub przy nadal występujących objawach przy negatywnym wyniku zalecamy oprócz serologii poparcie diagnozy metodami biologii molekularnej.
3. Niewykluczone są reakcje krzyżowe z *M. genitalium*, *M. Hominis*. Mogą również występować reakcje krzyżowe z surowicami EBV-pozytywnymi.

9. Literatura

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. Baum, H.V., Strubel, A., Nollert, J., Layh-Schmitt, G.: Two Cases of Fulminant *Mycoplasma Pneumoniae* Pneumonia within 4 Month. Infection 28 2000 No.3.
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

Przygotowanie próbek pacjentów i roztworu do płukania

▼ **Roztwór do płukania:** Koncentrat dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demin.

▼ **Rozcieńczenie próbki IgG w stosunku 1:101**

np.:

10 µl surowicy/osocza + 1000 µl buforu do rozcieńczania
(Roztwór do rozcieńczania surowicy jest gotowy do użycia)

▼ **Rozcieńczenie próbki IgA+M w stosunku 1:100**

Adsorpcja czynnika reumatoidalnego za pomocą RF-SorboTech

np.:

5 µl surowicy/osocza + 450 µl buforu do rozcieńczania +
1 kroplę RF SorboTech inkubować przez 15 min w temp.
pok.

Wykonanie badania

Inkubacja próbek



4x płukanie



Inkubacja
koniugatu



4x płukanie



Inkubacja substratu



Zatrzymanie



Pomiar ekstynkcji

30 minut w temperaturze 37°C.

30 minut w temperaturze 37°C.

30 minut w temperaturze 37°C.

100 µl próbek pacjentów

Próba ślepa (bufor do rozcieńczania) i kontrole

400 µl roztworu do płukania

dobrze wytrząsnąć

100 µl koniugatu

IgG, IgA+M

400 µl roztworu do płukania

dobrze wytrząsnąć

100 µl substratu

50 µl roztworu do zatrzymania reakcji

ostrożnie wstrząsnąć

Fotometr przy 450/620nm
(referencyjna długość fali 620-690nm)