

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

Objednací č.: EC214.00

barevné kódování : tmavomodrá

POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ

VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim

tel.: +49-6142-6909-0
fax: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Obsah

1. Účel použití	3
2. Princip testu	3
3. Obsah soupravy	3
3.1 Testovací kit IgG, IgA+M	3
4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití	3
5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění	4
6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)	4
7. Testování	4
7.1 Testovaný materiál	4
7.2 Příprava reagensů	4
7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH	5
7.4 Použití analyzátorů ELISA	5
8. Vyhodnocení testů	5
8.1 Kontrola funkčnosti testu	5
8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)	5
8.3 Vyhodnocení výsledků	6
8.4 Interpretační schéma	7
8.5 Limity testu	7
9. Literatura	7
10. Schéma provedení testu (Testablaufschemata)	8

1. Účel použití

Mycoplasma pn. polyvalentní ELISA slouží k semikvantitativnímu a kvalitativnímu důkazu protilátek IgG a společnému důkazu protilátek IgA a IgM v lidském séru. Důkaz protilátek IgG je nastaven tak, že detektuje především čerstvé infekce. Pro zjednodušenou a efektivnější diagnostiku se určují protilátky IgA a IgM s polyvalentním smíšeným konjugátem IgA+IgM společně.

2. Princip testu

Protilátka hledaná v lidském séru tvoří s antigenem fixovaným na mikrotitrační destičce imunokomplex. Nenavázané imunoglobuliny se vymyjí. Na tento komplex se naváže enzymový konjugát. Nenavázané imunoglobuliny se opět vymyjí. Po přidání substrátového roztoku (TMB) vznikne enzymovou aktivitou (peroxidáza) modré barvivo, jež se po přidání zastavovacího roztoku změní na žluté.

3. Obsah soupravy

3.1 Testovací kit IgG, IgA+M

1. **1 mikrotitrační destička**, skládající se z 96 jednotlivých oddělitelných jamek potažených antigenem, lyofilizované
2. **Ředící pufr PBS (modrý, ihned použitelný) 2 x 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. **Promývací roztok PBS (20x koncentrovaný) 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
4. **IgG negativní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
5. **IgG hraniční kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
6. **IgG pozitivní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
7. **IgA+M negativní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
8. **IgA+M hraniční kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
9. **IgA+M pozitivní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
10. **IgG konjugát (anti-human), 11ml**, (ovčí nebo ostrucha křivočará)-křen-peroxidáza-konjugát s proteinovými stabilizátory a konzervačním prostředkem v THAM, připravený k použití
11. **IgA+M konjugát (antihumánní směs IgA+IgM Gemisch), 11ml**, (ovce nebo koza) konjugát křenové peroxidázy s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou v tris pufru, ihned použitelný
12. **Substrátový roztok tetrametylbenzidin (3,3',5,5'TMB), 11ml**, ihned použitelné
13. **Zastavovací roztok citrát, 6ml**, obsahuje směs kyselin

4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití

Soupravu skladujte při teplotě 2 - 8°C. Doba použitelnosti jednotlivých reagensů je vyznačena na příslušném štítku; doba použitelnosti soupravy je uvedena v Certifikátu kontroly kvality.

1. Po odebrání potřebných jednotlivých jamek uskladněte zbývající část jednotlivých jamek/stripů v uzavřeném sáčku se sušidlem při teplotě 2 - 8°C. Činidla ihned po použití uskladněte opět při teplotě 2 - 8°C.
2. Konjugát a substrátový roztok TMB jsou citlivé na světlo a musí být skladovány ve tmě. Pokud by se substrátový roztok zabarvil, musí být zlikvidován.
3. Odebírejte pouze takové množství konjugátu, resp. TMB, jež je potřeba pro dané testování. V případě, že jste odebrali příliš velké množství konjugátu, resp. TMB, nesmí se vracet zpět a musí být zlikvidován.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	zředěný	+2 až +8°C	max. 6h
	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
mikrotitrační destička	po otevření	+2 až +8° (skladování v současně dodaném sáčku s vysoušecím sáčkem)	3 měsíce
revmatoidní faktor - absorbent	nezředěný, po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zředěný	+2 až +8°C	1 týden
konjugát	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
tetrametylbenzidin (TMB)	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
zastavovací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce

prací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po zředění (připravený k použití)	+2 až +25°C	4 týdny

5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění

1. Jako kontrolní séra se používají pouze taková séra, která byla testována a shledána negativními na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a antigen HBsAg. Přesto by měly být všechny vzorky, zředěné vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrační stripy považovány jako potenciálně infekční materiál a podle toho by s nimi mělo být opatrně zacházeno. Pro práci v laboratoři platí příslušné směrnice..
2. Součásti obsahující konzervační látky, citrátový zastavovací roztok a TMB působí dráždivě na kůži, oči a sliznice. Při kontaktu postižená místa ihned omyjte pod tekoucí vodou a případně vyhledejte lékaře.
3. Likvidace použitých materiálů probíhá podle příslušných směrnic platných v dané zemi.

6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Vícekanálová pipeta 50μl, 100μl
3. Mikropipety: 10μl, 100μl, 1000μl
4. Zkumavky
5. Utěrky z buničiny
6. Víčka na destičky ELISA
7. Odpadkové koše na infekční materiál
8. Ruční nebo automatická promývačka ELISA mikrotitračních destiček
9. Mikrofotometr na mikrotitrační destičky s filtrem 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm)
10. Inkubátor
11. RF-Sorbotech pro VIROTECH IgA+M ELISA s antihumáním smíšeným konjugátem IgA+IgM (viz rovněž Příprava reagensí).

7. Testování

Předpokladem pro získání správných výsledků je přesné dodržování pracovního předpisu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Testovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulantů), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

Zředění pacientů používejte vždy čerstvá.

Pro případ delšího skladování je třeba tato séra zmrazit. Zamezte opakovanému zamražení-rozmražení.

1. Používejte pouze čerstvá, nikoli inaktivovaná séra.
2. Nepoužívejte hyperlipidemické, hemolytické, mikrobiálně kontaminované vzorky a zkalená séra (falešně pozitivní/negativní výsledky).

7.2 Příprava reagensí

Diagnostika VIROTECH Diagnostics System nabízí vysoký stupeň flexibility tím, že umožňuje nasazení pufru k ředění a promývání, TMB, citrátového roztoku k ukončení reakce, jakož i konjugátu pro všechny šarže a parametry. Kontroly k okamžitému použití (pozitivní kontroly, cut-off kontroly, negativní kontroly) jsou specifické pro charakteristické hodnoty a používají se výhradně s šarží destiček uvedenou v certifikátu kontroly kvality.

1. Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před započítím inkubace zkontrolujte, zda bylo této teploty dosaženo.
2. Balení s testovacími stripy můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechna činidla temperována na pokojovou teplotu.
3. Všechny tekuté reagensie před upotřebením dobře protřepte.
4. Koncentrát pracího roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentráto tento koncentrát před zředěním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepte).
5. Vysoké titry IgG nebo revmatoidní faktory mohou specifický důkaz protilátek IgM rušit a vést k chybně pozitivním či chybně negativním výsledkům. **Pro správný společných důkaz protilátek IgA a IgM se smíšeným konjugátem IgA+IgM je proto nutné, séra předem upravit pomocí RF-SorboTech** (adsorpční prostředek VIROTECH). Při kontrolách IgA+M odpadá předběžná absorpce.

7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

1. Na test 100µl okamžitě použitelného zředovacího pufru (prázdná hodnota), negativní, mezní (cut-off) a pozitivní kontroly IgG-, IgA+M i zředěných sér pacientů pipetujte. Doporučujeme použít vždy dvě jamky (slepá hodnota, kontroly a séra pacientů; hraniční kontrola je vždy ve dvou jamkách.. Pracovní zředění sér pacienta : 1+100; např. 10µl sérum + 1ml zředovacího pufru.
2. Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (destička se zakryje víčkem).
3. Po ukončení inkubace se jamky promyjí čtyřikrát promývacím roztokem 350 - 400µl na každou jamku. Promývací roztok nenechte stát v jamkách a poslední zbytky kapaliny odstraňte vyklepáním na absorbující podložku.
4. Napipetujte 100µl konjugátu do všech jamek.
5. Inkubace konjugátu: po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (přikryto).
6. Po Inkubaci konjugátu následuje čtyřnásobné promytí (viz bod 3).
7. Napipetujte 100µl substrátového roztoku TMB do každé jamky.
8. Inkubace roztoku substrátu: 30 min. při teplotě 37°C (se zakrytím, uložení v temnu).
9. Reakce substrátu se zastaví citrátovým stop roztokem: napipetuje se do všech jamek po 50µl. Destičku opatrně a pečlivě protřepete poklepáním se strany tak, aby se kapaliny zcela promíchaly a obsah jamek je rovnoměrně žlutě zabarven.
10. Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnoty byl odečteno od absorbancí kontrol a vzorků.. Fotometrické měření by mělo být prováděno do doby jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Schéma provedení testu viz poslední stranu

7.4 Použití analyzátorů ELISA

Všechny testy ELISA VIROTECH Diagnostics mohou být zpracovávány pomocí procesorů ELISA. Uživatel je povinen provést pravidelnou validaci přístrojů.

VIROTECH Diagnostics doporučuje následující postup:

1. Při poskytnutí přístrojů, resp. větších opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
2. V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA překontrolovat a přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Překontrolování pomocí validační sady by mělo být prováděno minimálně jednou za čtvrt roku.
3. Při každém testovacím běhu musejí být splněna kritéria propuštění do oběhu v souvislosti s Certifikátem o kontrole kvality k příslušnému výrobku.

Tento postup zaručí bezvadnou funkci vašeho procesoru ELISA a navíc slouží k zajištění kvality laboratoře.

8. Vyhodnocení testů

Ihned použitelné kontroly slouží pro semikvantitativní stanovení specifických IgG, IgA a IgM protilátek, jejichž koncentrace je uváděna v jednotkách VIROTECH (=VE). Výkyvy podmíněné testováním jsou vyrovnávány výpočtovou metodou, čímž je dosahována vysoká reprodukovatelnost. Pro výpočet VE použijte střední hodnoty nebo OD-hodnoty.

8.1 Kontrola funkčnosti testu

a) Hodnoty optické density

OD-hodnota slepého vzorku musí být < 0,15

Hodnoty optické density negativních kontrol by měly být nižší než hodnoty optické density uváděné v certifikátu o kontrole kvality, hodnoty optické hustoty pozitivních kontrol i cut off kontrol by se měly nacházet nad hodnotami optické hustoty uváděnými v Certifikátu o kontrole kvality.

b) Jednotky VIROTECH (VE)

Jednotky VIROTECH (VE) cut off kontrol jsou definovány 10 VE. Vypočtené VE pozitivních kontrol by se měly pohybovat uvnitř rozmezí uváděných v certifikátu o kontrole kvality.

Pokud nejsou požadavky (hodnoty optické hustoty, VE) splněny, musí být test opakován.

8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)

Absorbance slepé (450/620nm) musí být od všech absorbancí odečtena.

$$\begin{aligned} \text{VE pozitivní kontrola} &= \frac{\text{OD pozitivní kontrola}}{\text{OD hraniční}} \times 10 \\ \text{VE vzorek} &= \frac{\text{OD vzorek}}{\text{OD hraniční}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Vyhodnocení výsledků

- a) V IgA+M pro všechny pacienty, v IgG pro pacienty > 14 let

Výsledek (VE) (IgG > 14 let, IgA+M)	Posouzení
< 9,0	Negativní
9,0 - 11,0	Mezní hodnota
> 11,0	Pozitivní

- b) V IgG pro děti (0 -14 let), jestliže IgA+M pozitivní

U dětí mezi 0 a 14 lety může být mezní rozsah (cut off) v IgG posunut dolů, protože VIROTECH ELISA v IgG je nastaven tak, aby se převážně detekovaly akutní infekce. Podmínkou pro použití tohoto schématu však je, aby sérum poskytovalo pozitivní výsledek IgA+M.

Výsledek (VE) (IgG 0 -14 let)	Posouzení
< 7,0	Negativní
7,0 - 8,0	Mezní hodnota
> 8,0	Pozitivní

- Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí nad hraničními hodnotami uváděného rozmezí, považují se na tyto vzorky za pozitivní.
- Pro bezpečný důkaz infekce je nutné určit obsah protilátek dvou vzorků séra. Jeden vzorek séra by měl být testován přímo po začátku infekce, druhý vzorek o 5 -10 dnů později (rekonvalescentní sérum). Koncentrace protilátek obou vzorků musí být určena současně, tj. při jednom testu. Správná diagnóza na základě hodnocení jediného vzorku séra není možná. Jelikož některé osoby nevytvářejí žádný IgM a zpravidla se netestují všechny 3 třídy protilátek (IgG, IgM a IgA), dosahuje se pomocí celkového stanovení IgG a IgA+M vysoké míry diagnostické senzitivity.
- Jsou-li naměřené hodnoty pod definovaným mezním rozsahem, nejsou ve vzorku k dispozici žádné měřitelné protilátky specifické pro antigen. Vzorky se posuzují jako negativní.

8.4 Interpretační schéma

IgG	IgA+M	Interpretace
-	-	- žádný zvýšený titr Ak proti <i>M. pneumoniae</i>. - žádné podezření na infekci <i>M. pneumoniae</i>. Při dále existující klinické symptomatice si vyžádejte průběžnou kontrolu či objasněte diferenciální diagnostikou.
-	+	- zvýšený titr Ak proti <i>M. pneumoniae</i> v IgA a/nebo IgM. - podezření na ranou fázi akutní infekce <i>M. pneumoniae</i>. Izolované chybně pozitivní výsledky IgA nebo IgM, které se zde mohou společně vyskytnout, nelze nikdy 100procentně vyloučit. K potvrzení lze doporučit kontrolu titru IgG za 5 -10 dnů nebo kontrolu pomocí imunoblotu (LINE).
+	+	- zvýšený titr Ak-Titer proti <i>M. pneumoniae</i>. - podezření na aktuální infekci <i>M. pneumoniae</i>.
+	-	- podezření na nedávno prodělanou infekci <i>M. pneumoniae</i>, IgA+M již klesl. - sérum Narbe nelze ve všech případech vyloučit.

8.5 Limity testu

1. Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a eventuálně další laboratorní nálezy, jež jsou k dispozici.
2. Infekci *Mycoplasma* je i přes zjištění anamnézy, klinického šetření, včetně standardní laboratoře a rentgenové kontroly obtížně odlišit od jiných infekcí horních a dolních dýchacích cest nebo atypických pneumonií. Při nejasných případech nebo dále trvajících symptomech při negativním nálezu doporučujeme kromě serologie diagnózu podpořit pomocí molekulárně biologického dokazování.
3. Nelze vyloučit křížové reakce s *M. genitalium* a *M. hominis*. Také séra pozitivní na EBV mohou vykazovat křížovou reakci.

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

Příprava vzorků a promývacího roztoku

▼ **Promývací roztok** : koncentrát doplnit dest./demin. vodou na 1 l

▼ **zředění Vzorky IgG**
1:101

např.:

10 µl séra/plazmy + 1000 µl ředícího roztoku na vzorek
(ředící roztok na vzorek se používá přímo)

▼ **zředění Vzorky IgA+M**
1:100

**adsorpce revmatoidního faktoru pomocí
RF-SorboTech**

např.:

5 µl sérum/plazmy + 450 µl ředícího roztoku na vzorek +
1 kapka RF- SorboTech , inkubace při pokojové teplotě
po dobu 15 minut

Schéma testu

inkubace vzorků



4 x promýt



inkubace
s konjugátem



4 x promýt



inkubace
se substrátem



Zastavení reakce
stop roztokem



změřit absorbanci

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C ve tmě

100 µl zředěného vzorku
100 µl kontrol

blank (ředící roztok na vzorek)

400 µl promývacího roztoku
po skončení promývání oklepat

100 µl konjugátu
IgG, IgA+M

400 µl promývacího roztoku
po skončení promývání oklepat

100 µl substrátu

50 µl stop roztoku
opatrně poklepat

**mikrofotometr při
450/620nm**
(Délka referenční vlny 620-690nm)