

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ЗАО

«Медико-биологический Союз»

М.В.Лосев

200 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«Мелиса Микоплазма-IgM»

Набор реагентов для иммуноферментного выявления
антител класса М к *Mycoplasma hominis*

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов «Мелиса Микоплазма-IgM» предназначен для выявления антител класса М к *Mycoplasma hominis* в сыворотке (плазме) крови человека методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе.

1.2 Набор рассчитан на проведение 96 или 192 определений, включая контрольные образцы.

1.3 При исследовании небольшого количества образцов на разборных планшетах возможно проведение 12 или 24 независимых постановок ИФА по 8 анализов в каждой, включая контрольные образцы.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип метода

Метод определения основан на двухстадийном твердофазном ИФА с применением рекомбинантного антигена *Mycoplasma hominis* и моноклональных антител к IgM человека.

На первой стадии анализа исследуемые сыворотки инкубируют с иммобилизованным на поверхности лунок планшета антигеном *Mycoplasma hominis*. При этом имеющиеся в сыворотке специфические антитела к *Mycoplasma hominis* связываются с антигенами на твердой фазе, образуя иммунные комплексы «антиген-антитело».

На второй стадии анализа специфические антитела выявляют с помощью конъюгата моноклональных антител против IgM человека с пероксидазой хрена. После отмывки несвязавшихся компонентов конъюгата выявляют комплекс «антиген-антитело-конъюгат», добавляя в лунки планшета раствор хромогена.

Реакцию останавливают стоп-реагентом. На спектрофотометре измеряют интенсивность окрашивания раствора в лунках планшета-иммуносорбента. Чем выше содержание специфических антител класса М к *Mycoplasma hominis* в сыворотке, тем интенсивнее окрашен раствор.

2.2 Набор реагентов выпускают в виде трех комплектов:

- комплект 1 для ручной постановки – на 96 определений;
- комплект 2 для ручной постановки – на 192 определения;
- комплект 3 для ручной постановки и автоматического анализатора – на 96 или 192 определения.

2.3 Состав комплектов приведен в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Наименование компонента	Комплект 1	Комплект 2	Комплект 3	
Планшет-иммуносорбент – рекомбинантный антиген <i>Mycoplasma hominis</i> , сорбированный в лунках планшетов	разборный, 1 шт.	разборный или моноклитный, 2 шт.	разборный, 1 шт.	разборный, 2 шт.

К+ – контрольный положительный образец, инактивированный – прозрачная красного цвета жидкость	1 фл. (2 мл)	1 фл. (2 мл)	1 фл. (2 мл)	1 фл. (2 мл)
К- – контрольный отрицательный образец, инактивированный – прозрачная желтого цвета жидкость	1 фл. (3 мл)	1 фл. (3 мл)	1 фл. (3 мл)	1 фл. (3 мл)
РБР-С – разводящий буферный раствор для сывороток – прозрачная розового цвета жидкость	1 фл. (12 мл)	1 фл. (20 мл) или 2 фл. (12 мл)	1 фл. (20 мл) или 2 фл. (12 мл)	2 фл. (20 мл) или 4 фл. (12 мл)
РК – раствор конъюгата – опалесцирующая зеленого цвета жидкость	1 фл. (12 мл)	1 фл. (20 мл) или 2 фл. (12 мл)	1 фл. (20 мл) или 2 фл. (12 мл)	2 фл. (20 мл) или 4 фл. (12 мл)
РХ – раствор хромогена – прозрачная розового цвета жидкость	1 фл. (13 мл)	2 фл. (13 мл)	1 фл. (20 мл) или 2 фл. (13 мл)	2 фл. (20 мл) или 4 фл. (13 мл)
ФСБ-Т(х25) – 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (26 мл)	2 фл. (26 мл)	1 фл. (50 мл) или 2 фл. (26 мл)	2 фл. (50 мл) или 4 фл. (26 мл)
Стоп-реагент – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (6 мл)	1 фл. (12 мл)	1 фл. (12 мл)	1 фл. (20 мл) или 2 фл. (12 мл)
Инструкция по применению	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.

Дополнительно в набор вкладывают клейкую пленку для планшета, ванночки для реагентов, одноразовые наконечники для дозаторов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Подлинность. Набор должен выявлять антитела класса М к *Mycoplasma hominis* в положительных сыворотках рабочей панели «РП-АТ-М(+/-)M.hominis», аттестованной ОБТК предприятия, и не давать ложноположительных результатов при исследовании сывороток этой же панели, не содержащих антитела к *Mycoplasma hominis*.

3.2 Чувствительность. Степень способности набора выявлять положительные сыворотки рабочей панели «РП-АТ-М(+/-)M.hominis» методом ИФА без ложноотрицательных результатов – 100 %.

3.2 Специфичность. Степень способности набора выявлять отрицательные сыворотки рабочей панели «РП-АТ-М(+/-)M.hominis» методом ИФА без ложноположительных результатов – 100 %.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609).

4.2 При работе с набором соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.3 Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Серная кислота, входящая в состав стоп-реагента, обладает раздражающим действием. При попадании стоп-реагента на кожу и слизистые промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.4 При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты (халат, шапочку или косынку, кожаные тапочки, одноразовые резиновые или пластиковые перчатки), т.к. контрольные образцы и исследуемые сыворотки следует рассматривать как потенциально инфицированные.

4.5 Твердые отходы, промывные растворы собирать в специальном контейнере, затем обработать дезсредствами, разрешенными в установленном порядке для применения на

территории РФ, например, раствором перекиси водорода (ГОСТ 177) с массовой долей 6 % при комнатной температуре не менее 2 ч.

4.6 Инструменты и оборудование, а также поверхности, на которых проводился анализ, обработать дезсредствами, разрешенными в установленном порядке для применения на территории РФ, например, раствором этилового спирта (ГОСТ Р 51652) с объемной долей 70 % в течение нескольких секунд.

4.7 Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Устройство для промывки микропланшетов или восьмиканальная полуавтоматическая пипетка со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей до 300 мкл;
- пипетка полуавтоматическая одноканальная с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей от 10 до 100 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования с погрешностью не более 3 %;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- фотометр для микропланшетов, позволяющий проводить измерение оптической плотности растворов в лунках планшетов при длинах волн 450 и 650 нм;
- анализатор автоматический открытого типа;
- цилиндр мерный второго класса точности вместимостью 1000 или 2000 мл;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от $2 ^\circ\text{C}$ до $8 ^\circ\text{C}$;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- вода очищенная;
- спирт этиловый;
- водорода перекись;
- перчатки резиновые.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Для выявления антител класса М к *Mycoplasma hominis* использовать сыворотку (плазму) крови человека как свежеприготовленную, так и хранившуюся не более одной недели при температуре от $2 ^\circ\text{C}$ до $8 ^\circ\text{C}$ или не более одного года при температуре минус $20 ^\circ\text{C}$.

6.2 Для проведения анализа использовать сыворотку (плазму) крови человека объемом не менее 15 мкл.

6.3 Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки готовить и хранить в условиях, исключающих возможность бактериального пророста. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования в течение 15 мин при частоте вращения 3000 об/мин. Не использовать сыворотки с выраженной бактериальной контаминацией.

6.4 Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

6.5 Перед проведением анализа каждую исследуемую сыворотку тщательно перемешать.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Несоблюдение описанных ниже требований может привести к искажению результатов анализа:

- при проведении анализа нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов;
- для приготовления растворов использовать чистую посуду;
- в процессе промывки полностью заполнять лунки планшета без переполнения и перетекания жидкости в соседние лунки;
- время между заполнением и опорожнением лунок планшета растворами и реагентами должно быть не менее 30 с;
- не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями;
- для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами использовать одноразовые наконечники для дозаторов;

- дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать раствором спирта этилового с объемной долей 70 %, не использовать хлорамин и другие хлорсодержащие вещества;
- при использовании промывателя следить за состоянием емкости для рабочего раствора ФСБ-Т и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста.

7.1 Подготовка компонентов набора

Перед проведением анализа выдержать набор в течение 30 мин при температуре от 17 °С до 27 °С.

7.1.1 Подготовка планшета-иммуносорбента

Планшет-иммуносорбент готов к использованию.

Хранение: неиспользованные стрипы в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 месяцев.

7.1.2 Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т

При наличии осадка выдержать флакон с ФСБ-Т(х25) при температуре 37 °С до полного растворения солей.

Содержимое флакона (флаконов) с ФСБ-Т(х25) перенести в мерный цилиндр, разбавить в 25 раз водой очищенной и тщательно перемешать.

При постановке ИФА на отдельных стрипах планшета-иммуносорбента в мерный цилиндр отобрать необходимые объемы ФСБ-Т(х25) и воды очищенной в соответствии с таблицей 2.

Т а б л и ц а 2 – Расход компонентов для постановки анализа на одном планшете

Объем, мл	Количество используемых стрипов, шт.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
комплект 1, комплект 2												
ФСБ-Т(х25)	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	14,0	16,0	18,0	20,0	22,0	24,0
Вода очищенная	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
РБР-С, РК	1,0/ 0,8	2,0/ 1,7	3,0/ 2,5	4,0/ 3,3	5,0/ 4,2	6,0/ 5,0	7,0/ 5,8	8,0/ 6,6	9,0/ 7,5	10,0/ 8,3	11,0/ 9,1	12,0/ 10
РХ	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Стоп-реагент	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
комплект 3												
ФСБ-Т(х25)	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0	24,0	28,0	32,0	36,0	40,0	44,0	48,0
Вода очищенная	до 100	до 200	до 300	до 400	до 500	до 600	до 700	до 800	до 900	до 1000	до 1100	до 1200
РБР-С, РК, РХ	2,0/ 1,7	4,0/ 3,3	6,0/ 5,0	8,0/ 6,6	10,0/ 8,3	12,0/ 10,0	14,0/ 11,6	16,0/ 13,3	18,0/ 15,0	20,0/ 16,6	22,0/ 18,3	24,0/ 20,0
Стоп-реагент	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

Хранение: неиспользованный ФСБ-Т(х25) в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.3 Подготовка РБР-С, РК, РХ

РБР-С, РК, РХ готовы к использованию.

В РК возможно выпадение осадка. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

Хранение: неиспользованные РБР-С, РК, РХ в закрытых флаконах в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.4 Подготовка контрольных образцов

К+, К- готовы к использованию.

Хранение: неиспользованные К+ и К- в закрытых флаконах в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.5 Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: неиспользованный стоп-реагент в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2 Проведение ИФА

7.2.1 Проведение ИФА при ручной постановке (комплект 1, комплект 2, комплект 3)

7.2.1.1 Необходимое количество стрипов вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.1.2 В лунку A1 внести 100 мкл K+, в лунки B1 и C1 внести по 100 мкл K-. В лунку D1 внести 100 мкл РБР-С для контроля РК.

При постановке ИФА на отдельных стрипах сохраняется порядок внесения контрольных образцов.

В остальные лунки планшета-иммуносорбента внести по 90 мкл РБР-С, затем по 10 мкл исследуемых сывороток. Содержимое лунок перемешать с помощью пипетки.

Планшет-иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.1.3 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет-иммуносорбент пять раз рабочим раствором ФСБ-Т. Для этого внести в каждую лунку планшета от 200 до 250 мкл раствора, а затем удалить содержимое лунок в емкость с дезраствором. Остатки раствора удалить, активно постукивая перевернутым (лунками вниз) планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

7.2.1.4 Внести в каждую лунку планшета-иммуносорбента по 100 мкл РК.

Планшет-иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.1.5 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет-иммуносорбент, как описано в 7.2.1.3.

7.2.1.6 Внести в каждую лунку планшета-иммуносорбента по 100 мкл РХ.

Планшет-иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и поместить на 20 мин в защищенное от света место при температуре от 20 °С до 27 °С.

7.2.1.7 Остановить реакцию внесением в каждую лунку планшета-иммуносорбента по 50 мкл стоп-реагента.

7.2.2 Проведение ИФА на автоматическом анализаторе (комплект 3)

7.2.2.1 Залить рабочий раствор ФСБ-Т в предназначенную для него емкость анализатора.

7.2.2.2 Залить остальные рабочие растворы, реагенты, контрольные образцы и анализируемые сыворотки в специальные контейнеры.

7.2.2.3 Поместить в анализатор планшет-иммуносорбент.

7.2.2.4 Задать программу проведения ИФА:

Внесение растворов	1 лунка – 100 мкл K+; 2 лунки – по 100 мкл K-; 1 лунка – 100 мкл РБР-С для контроля РК; остальные лунки – по 90 мкл РБР-С, затем по 10 мкл исследуемых сывороток
Инкубация	30 мин при температуре 37 °С
Промывка	5 раз рабочим раствором ФСБ-Т объемом от 200 до 250 мкл
Внесение раствора	все лунки – по 100 мкл РК
Инкубация	30 мин при температуре 37 °С
Внесение раствора	все лунки – по 100 мкл РХ
Инкубация	20 мин в защищенном от света месте при температуре от 20 °С до 27 °С
Внесение раствора	все лунки – по 50 мкл стоп-реагента

7.2.2.5 Провести разметку лунок планшета-иммуносорбента в схеме анализатора.

7.2.2.6 Включить анализатор.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину ОП растворов в лунках планшета-иммуносorbента на спектрофотометре в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне от 620 до 700 нм.

Допускается измерение ОП при одной длине волны – 450 нм. При этом нулевой уровень («бланк») установить по воздуху.

Время между остановкой реакции и измерением ОП должно быть не более 40 мин.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты учитывать только в том случае, если:

- значение ОП в лунке с контролем РК (ОПРК) $\leq 0,100$ о.е.;
- среднее значение ОП в лунках с К- (ОПК-ср.) $\leq 0,200$ о.е.;
- значение ОП в лунке с К+ не менее чем в 4 раза превышает значение (ОПК-ср.).

Рассчитать ОП_{крит.} по формуле

$$\text{ОП}_{\text{крит.}} = (\text{ОПК-ср.}) + 0,2, \quad (1)$$

где (ОПК-ср.) – среднее значение ОП (ОПК-) по двум лункам.

Ошибка метода ИФА составляет до 15 %, поэтому, если ОП исследуемой сыворотки больше или меньше ОП_{крит.} на 15 %, результат следует считать сомнительным. Необходим повторный анализ вновь взятого образца сыворотки крови данного пациента.

Результат теста считать положительным, если ОП исследуемой сыворотки больше $1,15 \times \text{ОП}_{\text{крит.}}$

Результат теста считать отрицательным, если ОП исследуемой сыворотки меньше $0,85 \times \text{ОП}_{\text{крит.}}$

При получении положительного результата с сыворотками в разведении 1:10, при необходимости, провести их дальнейшее титрование путем последовательных двукратных разведений РБР-С.

Титром сыворотки считать последнее разведение сыворотки, ОП которого превышает $0,85 \times \text{ОП}_{\text{крит.}}$

Соответствие величин индекса ОП титрам IgM к *Mycoplasma hominis*

Индекс	Титр	Интерпретация результатов
ОП образца $< 0,85 \text{ ОП}_{\text{крит.}}$	менее 1:8	Отрицательный
$0,85 \text{ ОП}_{\text{крит.}} < \text{ОП образца} < 1,15 \text{ ОП}_{\text{крит.}}$	1:9	Сомнительный
$1,15 \text{ ОП}_{\text{крит.}} < \text{ОП образца} < 3,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}}$	1:10 – 1:30	Слабоположительный
$3,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}} < \text{ОП образца} < 4,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}}$	1:30 – 1:50	Положительный
$4,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}} < \text{ОП образца} < 5,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}}$	1:50 – 1:70	Положительный
$5,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}} < \text{ОП образца} < 6,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}}$	1:70 – 1:100	Положительный
$6,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}} < \text{ОП образца} < 9,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}}$	1:100 – 1:300	Положительный
$9,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}} < \text{ОП образца} < 11,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}}$	1:300 – 1:600	Положительный
$11,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}} < \text{ОП образца} < 13,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}}$	1:600 – 1:1100	Положительный
$13,0 \text{ ОП}_{\text{крит.}} < \text{ОП образца}$	$> 1:1100$	Сильноположительный

Положительные результаты теста недостаточны для диагностики микоплазмоза, они должны подтверждаться данными других исследований, таких как гистология и посев, а также наличием клинических симптомов заболевания.

Высокий уровень IgG к *Mycoplasma hominis* может указывать как на перенесенную в прошлом, так и на текущую инфекцию. Высокий уровень IgM к *Mycoplasma hominis* является индикатором текущей инфекции. Наиболее значимым доказательством наличия активной микоплазмозной инфекции является одновременное повышение уровней IgG и IgM к *Mycoplasma hominis*. Повышение уровня IgA к *Mycoplasma hominis* свидетельствует о наличии активного инфекционного процесса на поверхности слизистых урогенитального тракта.

Отрицательные результаты теста не исключают инфицирование *Mycoplasma hominis*. Инфекционный процесс может находиться на слишком ранней стадии развития или не вызывать продукции антител в достаточном для теста количестве. Диагностическим признаком

инфекции является четырехкратное увеличение титра исследуемой сыворотки при сравнении титра парных сывороток, полученных с интервалом не менее 7 суток от одного пациента и определенных в одном опыте на одной планшете в трех повторях.

Настоящий тест является скрининговым и его результаты должны быть сопоставлены с данными анамнеза и клинических исследований. Для постановки окончательного диагноза рекомендуется исследование возбудителя на ДНК методом ПЦР и культивирование возбудителя на специфических средах. Совокупность результатов ИФА, ПЦР, клинических и эпидемиологических данных позволяет поставить окончательный диагноз.

10 СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Набор хранить в соответствии с СП 3.3.2.1248 при температуре от 2 °С до 8 °С в течение срока годности.

Транспортирование наборов производить в соответствии с СП 3.3.2.1248 при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре не выше 27 °С в течение 5 суток.

Замораживание наборов не допускается.

Для диагностики «in vitro».

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Отзывы о качестве наборов направлять на предприятие-изготовитель по адресу:

630117, г. Новосибирск – 117, а/я – 113, ЗАО «МБС»;

головной офис, тел./факс: 8-(383)-332-52-75;

отдел продаж, тел./факс: 8-(383)-332-81-38, 332-18-54, 339-91-97;

ОБТК, тел./факс: 8-(38341)-5-80-98, e-mail: obtk@mbu.ru