

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от __ 2008 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2008 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса А к *Mycoplasma pneumoniae*
«*Mycoplasma pneumoniae* – IgA – ИФА – БЕСТ»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов предназначен для выявления иммуноглобулинов класса А (IgA) к *Mycoplasma pneumoniae* в сыворотке (плазме) крови человека и может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях.

1.2. Набор реагентов рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок ИФА, при каждой из которых 3 лунки используют для постановки контролей.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Метод определения IgA к *Mycoplasma pneumoniae* – твердофазный иммуноферментный анализ. Во время первой инкубации происходит связывание специфических IgA к *Mycoplasma pneumoniae*, содержащихся в исследуемых образцах сывороток крови, с иммобилизованным на поверхности лунок стрипов рекомбинантным цитoadгезином Р1 *Mycoplasma pneumoniae*. На втором этапе антитела к IgA человека, меченные пероксидазой хрена, связываются с комплексом «антиген-антитело».

Во время третьей инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы «антиген-антитело».

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и начальником лаборатории С.А. Кротовым

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце IgA к *Mycoplasma pneumoniae*.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения ОП_{крит} анализируемые образцы оцениваются как положительные, сомнительные, отрицательные.

2.2. Состав набора

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

- планшет разборный с иммобилизованным рекомбинантным антигеном *Mycoplasma pneumoniae* — 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K⁺), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий иммуноглобулины класса А к *Mycoplasma pneumoniae*, лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета — 1 флакон; или прозрачная жидкость красного цвета — 1 флакон (0,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K⁻), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий иммуноглобулины класса А к *Mycoplasma pneumoniae*, лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета — 1 флакон; или прозрачная жидкость желтого цвета — 1 флакон (1,0 мл);
- конъюгат – антитела к IgA человека, меченные пероксидазой хрена, лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета, гигроскопична – 1 флакон;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – прозрачная жидкость желто-коричневого цвета — 1 флакон (3,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата (РК) – прозрачная жидкость зеленого цвета — 1 флакон (13,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (РС) – прозрачная жидкость желто-красного цвета — 1 флакон (13,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25)
- прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при нагревании — 1 флакон (28,0 мл);

- раствор ТМБ – прозрачная бесцветная жидкость — 1 флакон (13,0 мл);
- стоп-реагент – раствор серной кислоты, 0,5 моль/л – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (12,0 мл);
- пленка для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток на 4-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса А к *Mycoplasma pneumoniae* должен соответствовать требованиям СПП (рег. № 05-2-254 от 27.03.08), включающей образцы сывороток, содержащие специфические IgA к *Mycoplasma pneumoniae*: чувствительность по иммуноглобулинам класса А к *Mycoplasma pneumoniae* – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса А к *Mycoplasma pneumoniae* должен соответствовать требованиям СПП (рег. № 05-2-254 от 27.03.08), включающей образцы сывороток, не содержащие IgA к *Mycoplasma pneumoniae*: специфичность по иммуноглобулинам класса А к *Mycoplasma pneumoniae* – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 650 нм;
- термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;
- холодильник бытовой;

- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 до 300 мкл;
- промывочное устройство для планшета;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;
- цилиндр вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующий раствор, например, 2,5 % раствор велтолена.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для внесения образцов в лунки стрипов следует использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°C не более 5 суток, либо при минус (20±3)°C, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

7.1. Внимание! *Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.*

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25)°C.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Лиофилизированные контрольные образцы, конъюгат должны быть разведены в РПР, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами хранить при (2-8) °С.

Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.

Раствор тетраметилбензидина готов для использования. Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина.

При промывке лунки стрипов заполнять полностью (300-400 мкл промывочного раствора в зависимости от типа планшета) и не касаться лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор тетраметилбензидина), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Наконечники для пипеток (автоматических дозаторов) следует использовать однократно.

Посуду (ванночки), используемые для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

В случае повторного использования посуду (ванночки) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки) для раствора ТМБ сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, 2,5 % раствор велтолена (МУ-231-113 от 29.10.98).

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов

7.2.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см таблицу) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

Хранение: до 72 ч при температуре (2-8) °С.

7.2.2. Контрольные образцы

Лиофилизированные контрольные образцы растворить добавлением во флакон с K^+ 0,3 мл раствора для предварительного разведения (РПР), а во флакон с K^- 0,5 мл РПР. Тщательно перемешать.

Хранение: до 1 мес при температуре (2-8) °С.

Жидкие контрольные образцы готовы к использованию.

7.2.3. Растворы конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток.

Приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – до 1 месяца при температуре (2-8) °С.

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

Тщательно взболтать содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (РК).

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество (см таблицу) концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

7.2.4. Раствор ТМБ

Внимание! Раствор ТМБ готов к применению.

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

В пластиковую ванночку отобрать только необходимое в соответствии с числом используемых стрипов количество раствора ТМБ (см таблицу). Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Раствор конъюгата в рабочем разведении												
Концентрированный раствор конъюгата, мкл	α^*	$2 \times \alpha$	$3 \times \alpha$	$4 \times \alpha$	$5 \times \alpha$	$6 \times \alpha$	$7 \times \alpha$	$8 \times \alpha$	$9 \times \alpha$	$10 \times \alpha$	$11 \times \alpha$	$12 \times \alpha$
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Раствор ТМБ												
Раствор ТМБ, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

$\alpha^* = \text{_____}$ мкл

7.3. Проведение анализа

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в целфеновый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при (2-8)°С до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1.), контрольные образцы (п. 7.2.2.), концентрированный раствор конъюгата (п. 7.2.3.).

Внимание! Контрольные образцы и концентрированный раствор конъюгата должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до постановки ИФА и выдержаны при температуре (18-25)°С.

7.3.2. Перед постановкой ИФА лунки стрипов промыть один раз промывочным раствором, заливая в каждую лунку не менее 400 мкл промывочного раствора. По истечении 5 мин раствор аккуратно удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором.

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге. Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.3.3. Во все лунки стрипов внести по 80 мкл раствора для разведения сывороток (РС).

В одну лунку внести 20 мкл положительного контрольного образца (K^+), в две другие лунки по 20 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов, получая, таким образом, разведение 1:5. Внесение образцов

должно сопровождаться тщательным перемешиванием. При этом происходит изменение цвета с желто-красного на розовый.

Лунки заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

За 5 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении.

7.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

***Внимание!** Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (300–400 мкл промывочного раствора в зависимости от типа планшета). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.*

7.3.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении.

***Внимание!** Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

Заклеить лунки пленкой и инкубировать 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 5 раз промывочным раствором и удалить влагу, как описано выше.

7.3.6. Во все лунки внести по 100 мкл раствора ТМБ.

***Внимание!** Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

Стрипы поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре $(18-25)^\circ\text{C}$.

7.3.7. Остановить реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и через 2–3 минуты измерить оптическую плотность (ОП).

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–650 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом $ОП(K^+)$ должно быть не менее 0,80 ед. опт. пл. ($ОП(K^+) \geq 0,80$).
- среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом $ОП_{ср}(K^-)$ не должно превышать 0,25 ед. опт. пл. ($ОП_{ср}(K^-) \leq 0,25$).

Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,40$$

где $ОП_{ср}(K^-)$ — среднее значение ОП для отрицательного контрольного образца.

Исследуемый образец оценить как:

- отрицательный, т.е. не содержащий IgA к *Mycoplasma pneumoniae*, если полученное для него значение $ОП_{обр} \leq ОП_{крит} - 0,05$;
- положительный, т.е. содержащий IgA к *Mycoplasma pneumoniae*, если значение $ОП_{обр} \geq ОП_{крит} + 0,05$;
- сомнительный, если $ОП_{крит} - 0,05 < ОП_{обр} < ОП_{крит} + 0,05$.

Рекомендуем повторное исследование сомнительных сывороток.

Простой серологический тест не может быть использован для постановки диагноза. Все клинические и лабораторные данные должны быть рассмотрены в совокупности.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора обращаться:

в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу: 630559, п. Кольцово, Новосибирской обл, Новосибирского района, а/я 121, тел. (383) 336-92-49, 227-60-30, 227-67-64, тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44, 336-73-46.

E:mail: vbobtk@vector-best.ru

и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ
ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495)
120-60-95; 120-60-96.

Нач. лаборатории
бактериальных инфекций
ЗАО «Вектор-Бест»

Ректор ГОУ ВПО
НГМУ Росздрава

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



Кротов

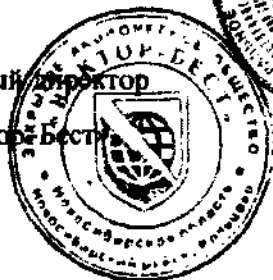
С.А. Кротов

Маринкин

И.О. Маринкин

Хусанов

М.Д. Хусанов



01

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от __ 2008 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2008 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления

иммуноглобулинов класса А к *Mycoplasma pneumoniae*

«*Mycoplasma pneumoniae* – IgA – ИФА – БЕСТ»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов предназначен для выявления иммуноглобулинов класса А (IgA) к *Mycoplasma pneumoniae* в сыворотке (плазме) крови человека и может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях.

1.2. Набор реагентов рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок ИФА, при каждой из которых 3 лунки используют для постановки контролей.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Метод определения IgA к *Mycoplasma pneumoniae* – твердофазный иммуноферментный анализ. Во время первой инкубации происходит связывание специфических IgA к *Mycoplasma pneumoniae*, содержащихся в исследуемых образцах сывороток крови, с иммобилизованным на поверхности лунок стрипов рекомбинантным цитоадгезином Р1 *Mycoplasma pneumoniae*. На втором этапе антитела к IgA человека, меченные пероксидазой хрена, связываются с комплексом «антиген-антитело».

Во время третьей инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы «антиген-антитело».

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и начальником лаборатории С.А. Кротовым

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце IgA к *Mycoplasma pneumoniae*.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения ОП_{крист} анализируемые образцы оцениваются как положительные, сомнительные, отрицательные.

2.2. Состав набора

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

- планшет разборный с иммобилизованным рекомбинантным антигеном *Mycoplasma pneumoniae* — 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий иммуноглобулины класса А к *Mycoplasma pneumoniae*, лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета — 1 флакон; или прозрачная жидкость красного цвета — 1 флакон (0,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий иммуноглобулины класса А к *Mycoplasma pneumoniae*, лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета — 1 флакон; или прозрачная жидкость желтого цвета — 1 флакон (1,0 мл);
- конъюгат – антитела к IgA человека, меченные пероксидазой хрена, лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета, гигроскопична – 1 флакон;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – прозрачная жидкость желто-коричневого цвета — 1 флакон (3,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата (РК) – прозрачная жидкость зеленого цвета — 1 флакон (13,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (РС) – прозрачная жидкость желто-красного цвета — 1 флакон (13,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25)
- прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при нагревании — 1 флакон (28,0 мл);

- раствор ТМБ – прозрачная бесцветная жидкость — 1 флакон (13,0 мл);
- стоп-реагент – раствор серной кислоты, 0,5 моль/л – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (12,0 мл);
- пленка для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток на 4-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса А к *Mycoplasma pneumoniae* должен соответствовать требованиям СПП (рег. № 05-2-254 от 27.03.08), включающей образцы сывороток, содержащие специфические IgA к *Mycoplasma pneumoniae*: чувствительность по иммуноглобулинам класса А к *Mycoplasma pneumoniae* – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса А к *Mycoplasma pneumoniae* должен соответствовать требованиям СПП (рег. № 05-2-254 от 27.03.08), включающей образцы сывороток, не содержащие IgA к *Mycoplasma pneumoniae*: специфичность по иммуноглобулинам класса А к *Mycoplasma pneumoniae* – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 650 нм;
- термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;
- холодильник бытовой;

- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 до 300 мкл;
- промывочное устройство для планшета;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;
- цилиндр вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующий раствор, например, 2,5 % раствор велтолена.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для внесения образцов в лунки стрипов следует использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°С не более 5 суток, либо при минус (20±3)°С, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

7.1. Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25)°С.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Лиофилизированные контрольные образцы, конъюгат должны быть разведены в РПР, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами хранить при (2-8) °С.

Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.

Раствор тетраметилбензидаина готов для использования. Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидаина.

При промывке лунки стрипов заполнять полностью (300-400 мкл промывочного раствора в зависимости от типа планшета) и не касаться лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор тетраметилбензидаина), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Наконечники для пипеток (автоматических дозаторов) следует использовать однократно.

Посуду (ванночки), используемые для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

В случае повторного использования посуду (ванночки) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки) для раствора ТМБ сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, 2,5 % раствор велтолена (МУ-231-113 от 29.10.98).

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов

7.2.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см таблицу) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

Хранение: до 72 ч при температуре (2-8) °С.

7.2.2. Контрольные образцы

Лиофилизированные контрольные образцы растворить добавлением во флакон с K^+ 0,3 мл раствора для предварительного разведения (РПР), а во флакон с K^- 0,5 мл РПР. Тщательно перемешать.

Хранение: до 1 мес при температуре (2-8) °С.

Жидкие контрольные образцы готовы к использованию.

7.2.3. Растворы конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток.

Приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – до 1 месяца при температуре (2-8) °С.

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

Тщательно взболтать содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (РК).

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество (см таблицу) концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

7.2.4. Раствор ТМБ

Внимание! Раствор ТМБ готов к применению.

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

В пластиковую ванночку отобрать только необходимое в соответствии с числом используемых стрипов количество раствора ТМБ (см таблицу). Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Раствор конъюгата в рабочем разведении												
Концентрированный раствор конъюгата, мкл	α^*	2× α	3× α	4× α	5× α	6× α	7× α	8× α	9× α	10× α	11× α	12× α
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Раствор ТМБ												
Раствор ТМБ, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

$\alpha^* = \text{_____}$ мкл

7.3. Проведение анализа

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при (2-8)°С до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1.), контрольные образцы (п. 7.2.2.), концентрированный раствор конъюгата (п. 7.2.3.).

Внимание! Контрольные образцы и концентрированный раствор конъюгата должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до постановки ИФА и выдержаны при температуре (18-25)°С.

7.3.2. Перед постановкой ИФА лунки стрипов промыть один раз промывочным раствором, заливая в каждую лунку не менее 400 мкл промывочного раствора. По истечении 5 мин раствор аккуратно удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором.

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге. Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.3.3. Во все лунки стрипов внести по 80 мкл раствора для разведения сывороток (РС).

В одну лунку внести 20 мкл положительного контрольного образца (K^+), в две другие лунки по 20 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов, получая, таким образом, разведение 1:5. Внесение образцов

должно сопровождаться тщательным перемешиванием. При этом происходит изменение цвета с желто-красного на розовый.

Лунки заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

За 5 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении.

7.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

***Внимание!** Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (300-400 мкл промывочного раствора в зависимости от типа планшета). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.*

7.3.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении.

***Внимание!** Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

Заклеить лунки пленкой и инкубировать 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 5 раз промывочным раствором и удалить влагу, как описано выше.

7.3.6. Во все лунки внести по 100 мкл раствора ТМБ.

***Внимание!** Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

Стрипы поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре $(18-25)^\circ\text{C}$.

7.3.7. Остановить реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты измерить оптическую плотность (ОП).

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом ОП(К⁺) должно быть не менее 0,80 ед. опт. пл. (ОПК⁺ ≥ 0,80).
- среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ОП_{ср}(К⁻) не должно превышать 0,25 ед. опт. пл. (ОП_{ср}К⁻ ≤ 0,25).

Вычислить критическое значение оптической плотности (ОП_{крит}) по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}}(\text{К}^-) + 0,40$$

где ОП_{ср}(К⁻) — среднее значение ОП для отрицательного контрольного образца.

Исследуемый образец оценить как:

- отрицательный, т.е. не содержащий IgA к *Mycoplasma pneumoniae*, если полученное для него значение ОП_{обр} ≤ ОП_{крит} - 0,05;
- положительный, т.е. содержащий IgA к *Mycoplasma pneumoniae*, если значение ОП_{обр} ≥ ОП_{крит} + 0,05;
- сомнительный, если ОП_{крит} - 0,05 < ОП_{обр} < ОП_{крит} + 0,05.

Рекомендуем повторное исследование сомнительных сывороток.

Простой серологический тест не может быть использован для постановки диагноза. Все клинические и лабораторные данные должны быть рассмотрены в совокупности.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора обращаться:

в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу: 630559, п. Кольцово, Новосибирской обл, Новосибирского района, а/я 121, тел. (383) 336-92-49, 227-60-30, 227-67-64, тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44, 336-73-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ
ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495)
120-60-95; 120-60-96.

Нач. лаборатории

бактериальных инфекций

ЗАО «Вектор-Бест»

Кротов

С.А. Кротов

Проректор по НР и ПП

ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава

член-корреспондента РАМН, профессор



Огородова

Л.М. Огородова

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



Хусанов

М.Д. Хусанов