

УТВЕРЖДЕНА

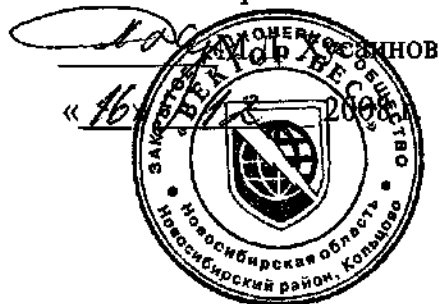
Приказом Росздравнадзора

от __ 2008 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



ИНСТРУКЦИЯ

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М (IgM) 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 IgM к *Mycoplasma pneumoniae* – твердофазный иммуноферментный анализ. Во время первой инкубации происходит связывание специфических IgM 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 IgM 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 IgM 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 М к *Mycoplasma pneumoniae* – прозрачная жидкость красного цвета — 1 флакон (0,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K⁻), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий иммуноглобулины класса М к *Mycoplasma pneumoniae* – прозрачная жидкость желтого цвета — 1 флакон (1,0 мл);
- конъюгат – антитела к IgM 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 — 2 флакона (по 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 или с желтоватым оттенком жидкость — 1 флакон (13,0 мл);
- стоп-реагент – раствор серной кислоты, 0,5 моль/л – прозрачная бесцветная жидкость — 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета — 3 шт.;
- ванночками для реагентов — 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 4-200 мкл — 16 шт.;
- планшетом для предварительного разведения исследуемых образцов – планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса М к *Mycoplasma pneumoniae* должен соответствовать требованиям СПП (рег. № 05-2-255 от 02.12.08), включающей образцы сывороток, содержащие специфические IgM к *Mycoplasma pneumoniae*: чувствительность по иммуноглобулинам класса М к *Mycoplasma pneumoniae* – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса М к *Mycoplasma pneumoniae* должен соответствовать требованиям СПП (рег. № 05-2-255 от 02.12.08), включающей образцы сывороток, не содержащие IgM к *Mycoplasma pneumoniae*: специфичность по иммуноглобулинам класса М 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 1.2.731-99 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 1000 мл;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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 компоненты должны быть восстановлены, 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 сразу после постановки реакции поместить в холодильник (2-8)°C.

Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.

1

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

При промывке лунки стрипов заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через края лунок, и не касаясь 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».

Запрещается повторное использование планшета для предварительного разведения сывороток.

При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

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, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (*четвертичных аммониевых соединений*), спиртов, третичных аминов.

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать во время проведения ИФА 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

Контрольные образцы (K^+ и K^-) готовы к использованию.

Хранение: до конца срока годности набора при температуре (2-8) °С.

7.2.3. Исследуемые образцы

Внимание! Предварительное разведение исследуемых образцов готовить непосредственно перед проведением ИФА.

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для разведения сывороток (РС). Для этого во вспомогательный ряд пробирок или в лунки вспомогательного планшета внести по 90 мкл РС и добавить по 10 мкл цельных образцов сыворотки (плазмы), тщательно перемешать.

7.2.4. 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.

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												
Конъюгат (концентрат), 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

$\alpha^* = 80$ мкл

7.2.5. 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).

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 температуре (2-8)°С до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1.), исследуемые образцы (п. 7.2.3.), концентрированный раствор конъюгата (п. 7.2.4.).

Внимание! Концентрированный раствор конъюгата должен быть приготовлен, как минимум, за 15 мин до постановки ИФА и выдержан при температуре (18-25)°С.

7.3.2. Перед постановкой ИФА лунки стрипов промыть один раз промывочным раствором, заливая в каждую лунку по 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 90 мкл раствора для разведения сывороток (РС).

В одну лунку внести 10 мкл положительного контрольного образца (K^+), в две другие лунки по 10 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), в остальные лунки – по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов, получая таким образом, разведение 1:100. Внесение образцов должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).

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 (400 мкл промывочного раствора). 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:

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

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

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,25$$

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

Исследуемый образец оценить как:

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

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: ybobtk@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

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткач

В.К. Ткач

Зав. кафедры КЛД РМАПО
д.м.н., профессор



В.В. Долгов

Подпись *В.В. Долгова*
удостоверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
подпись: *Медведев Г.В.*

13.01.09

А