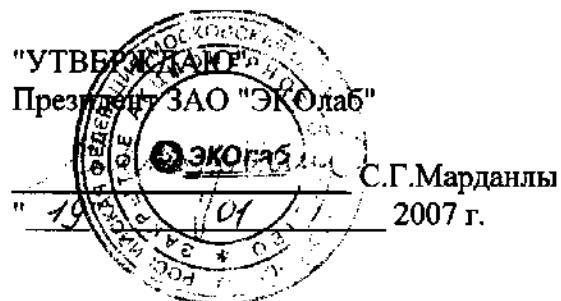


УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 200__ г. № _____



**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ
КЛАССА IgM К MYCOPLASMA PNEUMONIAE
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
(ИФА-Мико-пневмо-IgM)**

Регистрационное удостоверение № от "..." 200__ г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор применяется для выявления видоспецифических антител класса IgM к Mycoplasma pneumoniae в сыворотке (плазме) крови людей методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

При наличии в исследуемом образце антител класса IgM к Mycoplasma pneumoniae они связываются с антигеном, сорбированным на поверхности лунок полистиролового планшета, этот комплекс, в свою очередь, связывается с конъюгатом – антителами против IgM человека, мечеными пероксидазой хрена. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело-конъюгат" выявляется по реакции с субстратом пероксидазы – тетраметилбензидином, в результате которой бесцветное содержимое лунок приобретает голубой цвет, изменение цвета регистрируется по оптической плотности раствора в лунке планшета с помощью спектрофотометра.

2.2. Состав набора

Реагент 1 – иммуносорбент – очищенный антиген Mycoplasma pneumoniae, сорбированный на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном - 1 штука.

Реагент 2 – отрицательная контрольная сыворотка (K⁻) – жидкая сыворотка крови человека, не содержащая антитела к Mycoplasma pneumoniae, инактивирована прогреванием при 56 °C в течение 30 мин, не содержит HBsAg, антитела к ВГС, ВИЧ-1,2; содержит

мертиолят в конечной концентрации 0,01 %; прозрачная бесцветная жидкость

- 1 флакон (1,2 мл).

Реагент 3 - положительная контрольная сыворотка (K^+) - жидкая сыворотка крови человека, содержащая антитела к *Mycoplasma pneumoniae*, инактивирована прогреванием при 56 °C в течение 2 ч, не содержит HBsAg, антитела к ВГС, ВИЧ-1,2; содержит мертиолят в конечной концентрации 0,01 %; прозрачная бесцветная жидкость

- 1 флакон (1,2 мл).

Реагент 4 - контрольная сыворотка уровня "среза" ($K_{пор}$) - жидкая сыворотка крови человека, содержащая антитела к *Mycoplasma pneumoniae* в "пороговом" титре, инактивирована прогреванием при 56 °C в течение 2 ч, не содержит HBsAg, антитела к ВГС, ВИЧ-1,2; содержит мертиолят в конечной концентрации 0,01 %; прозрачная бесцветная жидкость

- 1 флакон (1,2 мл).

Реагент 5 - блокирующий раствор (БР) - козья сыворотка, содержащая антитела к иммуноглобулинам человека класса IgM и не содержащая антитела к другим классам иммуноглобулинов человека; прозрачная бесцветная жидкость -

1 флакон (7,5 мл).

Реагент 6 – конъюгат - антитела диагностические мышиные против иммуноглобулинов человека класса IgM, меченые пероксидазой; прозрачная жидкость розового цвета

- 1 флакон (11 мл).

Реагент 7 - раствор индикаторный (РИ); прозрачная бесцветная жидкость

- 1 флакон (12 мл).

Реагент 8 - концентрат (25х) отмывающего раствора, содержащий детергент, (ОР)к; прозрачная, слегка опалесцирующая пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °C в течение 30 мин.

- 1 флакон (80 мл).

Реагент 9 - раствор для разведения образцов (РРО); прозрачная жидкость синего цвета

- 1 флакон (60 мл).

Реагент 10 – стоп-реагент - 0,9 М кислота серная; прозрачная бесцветная жидкость

- 1 флакон (12 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Набор «ИФА-мико-пневмо-IgM» рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные образцы.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Меры предосторожности – соблюдение "Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при рабо-

те в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР" (Москва, 1981 г.).

Набор является полностью биологически безопасным, т.к. антиген иммуносорбента и контрольные образцы инактивированы и не содержат инфекционного агента. Однако при обследовании клинических материалов необходимо соблюдать меры предосторожности и обращаться с ними как потенциально инфицированными:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы подвергать обработке 6% раствором перекиси водорода (не менее 6 ч).

Достоверность результатов зависит от строгого выполнения следующих правил:

- Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.
- Перед постановкой реакций все компоненты тест-системы необходимо выдерживать не менее 20 мин при комнатной температуре (18-25)°C.
- Сразу после постановки реакции плотно закрытые флаконы с исходными компонентами необходимо поместить в холодильник (при 2-8 °C), использовать в течение 1 мес.
- При промывке планшета лунки заполнять полностью (350 мкл промывочного раствора) и не касаться лунок наконечниками пипетки.
- Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.
- При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов.
- Наконечники для пипеток, используемые для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами использовать однократно.
- Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с хромогеном (ТМБ), в случае повторного использования, сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем водой очищенной (дистиллированной или деионизированной).
- При использовании автоматического вошера или гребенки необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть проростов. Не реже одного раза в неделю промывать емкость для промывочного раствора и шланги 70 % спиртом.

- Для отбора исследуемых образцов и компонентов тест-системы использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Дозаторы (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 3 %.

- Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Используется свежеполученная сыворотка (плазма) крови. Забор крови должен быть произведен согласно стандартной процедуре.

Допускается хранение образцов при температуре от 2 до 8 °С не более 48 ч или при температуре минус 20 °С и ниже не более 3 мес. Гемолиз и бактериальная контаминация могут привести к ложноположительным результатам.

Образцы могут подвергаться замораживанию/оттаиванию только однократно. После размораживания образцы тщательно перемешать

Образцы, содержащие осадок, перед анализом должны быть очищены центрифугированием в течение 5 мин при 5-10 тыс об/мин.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка исследуемых образцов

Все реагенты до начала анализа выдержать не менее 20 мин при температуре от 18 до 24 °С..

1. Приготовление отмывающего раствора (ОР)

(ОР)_к интенсивно перемешать (в случае выпадения осадка – прогреть при температуре 37 °С в течение 30 мин до полного растворения солей), развести водой очищенной в соотношении 1:25. В зависимости от числа используемых стрипов, отобрать необходимое количество концентрата и довести водой очищенной до объема, указанного в табл. 1.

Таблица 1

Компонент	Объем компонента на ... стрипов					
	2	4	6	8	10	12
(ОР) _к , мл	7	13	20	27	33	40
Вода очищенная, мл	до 175	до 325	до 500	до 675	до 825	до 1000

Раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 2 недель.

2. Подготовка исследуемых образцов

По 10 мкл каждого образца смешать с 0,5 мл РРО. 0,075 мл полученного разведения смешать с 0,075 мл БР (разведение 1:102), тщательно перемешать пипетированием, выдержать 30 мин при температуре от 18 до 24 °С.

3. Иммуносорбент, K^- , K^+ , $K_{пор}$, РРО, БР, конъюгат, РИ, стоп-реагент – готовы к применению.

7.2. Проведение анализа

1. Извлечь из пакета планшет или необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в герметично закрытом пакете не более 1 мес.

2.. Внести (соблюдая указанную последовательность):

- в лунку A1 - 100 мкл РРО;
- по 100 мкл каждой контрольной сыворотки в 2 лунки (K^+ – в лунки B1 и C1; K^- – лунки D1 и E1; $K_{пор}$ – в лунки F1, G1);
- по 100 мкл подготовленных исследуемых образцов - в оставшиеся лунки (по 1 лунке на 1 образец).

Инкубировать 30 мин при температуре от 18 до 24°С в защищенном от света месте.

Внимание! Соблюдение температурного режима инкубации планшетов крайне важно для получения достоверных результатов.

3. С помощью промывателя удалить жидкость из лунок, 5 раз промыть планшет ОР, внося в лунки не менее 350 мкл раствора. При ручной отмывке внесенный в лунки ОР необходимо выдерживать не менее 30 с. По окончании промывки удалить влагу из лунок, постукивая планшетом по сложенной вчетверо фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

4. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата, инкубировать 30 мин при температуре от 18 до 24°С в защищенном от света месте.

5. С помощью промывателя удалить конъюгат из лунок, 5 раз промыть планшет ОР, как указано в п. 2.3.

6. Во все лунки внести по 100 мкл РИ, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и инкубировать 10 мин при температуре от 18 до 24°С.

7. Во все лунки внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и приступить к регистрации результатов.

8. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически не позднее 10 мин после остановки реакции (внесения стоп-реагента), измеряя оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм. В качестве уровня "бланк" (оптический нуль фотометра) используют ОП

содержимого лунки А1. При измерении ОП образцов против воздуха ОП_{бланк} должна вычитаться из ОП образцов.

Результаты ИФА учитывать при следующих условиях:

среднее значение ОП в лунках с K^+ не менее 0,6;

среднее значение ОП в лунках с $K_{пор}$ не менее 0,2;

среднее значение ОП в лунках с K^- не более 0,15.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Исследуемые образцы учитываются:

как положительные при ОП выше 1,1(ОП_{Кпор}),

как отрицательные при ОП ниже 0,9(ОП_{Кпор}).

При ОП исследуемого образца, лежащей в диапазоне от 0,9(ОП_{Кпор}) до 1,1(ОП_{Кпор}), пациента рекомендуется обследовать повторно..

9. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Срок годности набора – 1 год

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя в сухом, защищенном от прямых солнечных лучей месте при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1. ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-30-85 – отдел сбыта, 3-37-30 – ОБТК, факс (49643) 3-37-30.

Директор по производству
диагностических препаратов

/ А. Д. Осинская /