

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20 ____ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»



Директор
ООО «ИмДи-спектр»

Н.А. Кривенчук

20 ____ г.

ИНСТРУКЦИЯ

ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

«Микоплазмоз-IgG-антитела» -

ТЕСТ-СИСТЕМА ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА G к *Mycoplasma hominis*

1. Назначение

1.1 Выявление антител класса G к *Mycoplasma hominis* в сыворотке (плазме) крови человека и при проведении серозидемиологических исследований.

1.2 Набор рассчитан на проведение анализа 45 неизвестных и 1 контрольного положительного образца в двух повторях, 1 контрольного отрицательного образца в трех повторях, 1 контроля конъюгата (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия

Принцип действия набора реагентов основан на непрямом иммуноферментном анализе. Анализ проводят в две стадии. На первой стадии исследуемые образцы инкубируют в лунках планшета с иммобилизованным антигеном *Mycoplasma hominis*. Если в сыворотке (плазме) содержатся антитела к *Mycoplasma hominis*, образуется комплекс антиген-антитело. После промывки планшета в лунки планшета вносят антивидовой конъюгат (антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена), который связывается с антителами класса G к *Mycoplasma hominis*, если они присутствуют в образце. Визуализация образовавшегося комплекса «антиген-антитело-конъюгат» происходит за счет ферментативной реакции пероксидазы с субстратной смесью и образования окрашенного продукта. После остановки ферментативной реакции раствором серной кислоты (стоп-реагент) результаты анализа учитывают фотометрически. Величина оптической плотности (ОП) окрашенной хромогенной смеси пропорциональна концентрации специфических антител в образце сыворотки или плазмы.

2.2 Состав набора

- планшет разборный (12 восьмилучных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном *Mycoplasma hominis* (иммуносорбент) - 1 шт.;
- контрольный положительный образец на основе сыворотки крови человека, содержащий IgG к *Mycoplasma hominis* (К+) - 1 флакон (1,5 мл);
- контрольный отрицательный образец на основе сыворотки крови человека, не содержащий IgG к *Mycoplasma hominis* (К-) - 1 флакон (1,5 мл);
- раствор конъюгата мышиных моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, (РКг) - 1 флакон (13,0 мл);
- буферный раствор для разведения сывороток, (РБР-С) - 1 флакон (11 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т(концентрат x25)) - 1 флакон (26,0 мл).
- раствор тетраметилбензидина, (ТМБ-субстрат) - 1 флакон (13,0 мл).

- стоп-реагент - 1 флакон (6,0 мл);
- пленка для заклеивания планшета - 2 шт.;
- ванночка для реагентов - 2 шт.;
- наконечники для пипетки на 4-200 мкл - 16 шт..

3. Аналитические и диагностические характеристики

Набор реагентов «Микоплазмоз-IgG-антитела» предназначен для выявления антител класса G к *Mycoplasma hominis* в сыворотке (плазме) крови человека и при проведении сероэпидемиологических исследований.

Специфичность выявления иммуноглобулинов класса G *Mycoplasma hominis* по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G *Mycoplasma hominis* по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

4. Меры предосторожности

4.1 Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2 Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует 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.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как в состав набора входят компоненты крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

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

5. Оборудование и материалы

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм;

- прибор, позволяющий производить инкубирование при температуре 37 ± 1 °C (термостат);

- промывочное устройство для планшетов;

- холодильник бытовой;

- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 20 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 20 до 300 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- перчатки резиновые хирургические (ГОСТ 3-88);

- бумага фильтровальная лабораторная (ГОСТ 12026-76);

- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл (ГОСТ 1770-74Е);

- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72).

6. Анализируемые образцы

Для проведения анализа используют образцы сыворотки или плазмы крови человека объемом не менее 50 мкл. Желательно использовать свежеприготовленные образцы сыворотки (плазмы) крови, допускается использование образцов, хранившихся при температуре 2 - 8 °С не более 7 сут, либо при минус 20 °С не более 3 мес.

Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность контаминации посторонней микрофлорой.

При необходимости осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования в течение 10-15 мин при 3000 об/мин.

Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией, не использовать термоинактивированные сыворотки и сыворотки с добавлением азида натрия. Избегать повторных циклов замораживания и оттаивания образцов. Для возможного повторного исследования образца сыворотки желательно образец разделить на аликвоты, которые хранить при температуре 2 - 8 °С не более 7 сут, либо при минус 20 °С не более 3 мес.

Не допускать тестирование пула, содержащего несколько образцов сывороток. Каждый образец сыворотки или раствора необходимо отбирать новым игольником. Для отбора исследуемых проб и компонентов применять автоматические пипетки.

7. Проведение анализа

7.1 Подготовка к анализу

7.1.1 Извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре 18-25 °С в течение времени не менее 30 мин.

7.1.2 Подготовка планшета.

Вынуть из пакета и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в герметично закрытом пакете при температуре 2 - 8 °С в течение всего срока годности.

7.1.3 Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т

При наличии во флаконе с ФСБ-Т(концентрат x25) визуально определяемого осадка солей флакон с концентратом выдержать при температуре 37 °С до полного растворения солей.

Содержимое флакона с ФСБ-Т(концентрат x25) перенести в мерный цилиндр вместимостью 1 л и довести объем раствора до 650 мл дистиллированной водой.

В случае использования одного или нескольких стрипов разборного планшета в мерный цилиндр внести концентрат ФСБ-Т из флакона и добавить дистиллированную воду в соответствии с таблицей.

Таблица

Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т												
Количество используемых стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т (концентрат x25), мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26
Вода дистиллированная, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 650

Хранение: неиспользованный ФСБ-Т (концентрат x25) хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора, рабочий раствор ФСБ-Т - при температуре от 2 до 8 °С в течение двух недель

7.1.4 Приготовление контрольных образцов

K^+ и K^- готовы для использования.

Хранение: после вскрытия флакона контрольные образцы хранить при температуре от 20 до 25 °С до 48 ч, при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

7.1.5. Приготовление РБР-С, РКг, ТМБ-субстрата и стоп-реагента

РБР-С, РКг, ТМБ-субстрат и стоп-реагент – готовы для использования.

Хранение: после вскрытия флакона раствор хранить в закрытом виде при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора. ТМБ-субстрат хранить в защищенном от света месте.

7.2. Проведение иммуноферментного анализа

ПЕРВАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.1 В лунки А1 и В1 планшета внести по 100 мкл K^+ контрольного положительного образца, в лунки С1, Д1 и Е1 внести по 100 мкл K^- контрольного отрицательного образца, в лунку F1 внести 80 мкл РБР-С для контроля конъюгата. В остальные лунки планшета внести по 80 мкл РБР-С и по 20 мкл образцов исследуемых сывороток. Таким образом, исследуемые сыворотки в лунке разбавляются в 5 раз.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10-15 мин.

После этого планшет закрыть пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1) °С.

Внимание! Пленка предназначена для одноразового использования!

7.2.2 По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т пять раз с помощью автоматического промывателя или многоканальной пипетки, при этом в каждую лунку планшета вносить не менее 250 мкл раствора в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 10 сек, по окончании промывки остатки жидкости удалить, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

ВТОРАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.3 После промывки и удаления влаги в каждую лунку планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата (РКг). Планшет закрыть пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1) °С. Для внесения рабочего РКг использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.2.4 По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т 5 раз и удалить остатки влаги из планшета (см. п.7.2.2).

ТРЕТЬЯ (ФЕРМЕНТАТИВНАЯ) СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.5 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (ТМБ-субстрат). Планшет инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при температуре (37±1) °С.

Для внесения ТМБ-субстрата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в комплект набора.

Во избежание ложных результатов при раскапывании ТМБ-субстрата:

- а) не касайтесь стенок лунок планшета наконечниками;*
- б) избегайте образования аэрозолей и попадания субстратной смеси на внутренний фильтр пипетки.*

7.2.6 Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и ТМБ-субстрат, по 50 мкл стоп-реагента для остановки ферментативной реакции.

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

Схема проведения анализа

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном *Mycoplasma hominis*

↓
Внести:

ПЕРВАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ 2x100 мкл K⁺, 3x100 мкл K⁻, 1x80 мкл РБР-С,
по 80 мкл РБР-С, по 20 мкл образцов сывороток во все остальные лунки

↓

Инкубировать 30 мин, при (37±1) °С

↓

Промыть:

Рабочим раствором ФСБ-Т (не менее 250 мкл в каждую лунку), 5 раз

↓

Внести:

ВТОРАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ по 100 мкл раствора конъюгата (РКг)

↓

Инкубировать 30 мин при (37±1) °С

↓

Промыть:

Рабочим раствором ФСБ-Т (не менее 250 мкл в каждую лунку), 5 раз

↓

Внести:

ТРЕТЬЯ (ФЕРМЕНТАТИВНАЯ) СТАДИЯ РЕАКЦИИ по 100 мкл ТМБ-субстрата

↓

Инкубировать 15 мин при (37±1) °С в защищенном от света месте

↓

Внести:

по 50 мкл стоп-реагента

↓

Измерять при 450 нм

8. Регистрация результатов анализа

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху. Измерение проводят сразу или в течение 15 мин после остановки реакции.

9. Учет и оценка результатов

Результаты учитывают только в том случае, если:

- среднее значение ОП в лунках с контролем конъюгата ОПККг не превышает 0,15,
- среднее значение в лунках с K⁻ ОПК⁻(ср.) не более 0,2,
- среднее значение в лунках с K⁺ ОПК⁺(ср.) не менее 1,0.

В противном случае исследование необходимо повторить.

На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности (ОПкрит) по формуле:

ОПкрит. рассчитывают по формуле:

$$\text{ОПкрит.} = \text{ОПК}^-(\text{ср.}) + 0,25$$

Ошибка метода ИФА составляет до 15 %, поэтому, если ОП исследуемого образца сыворотки больше или меньше ОПкрит. на 15 %, результат следует считать

сомнительным. Необходимо повторить анализ вновь взятого образца сыворотки крови данного пациента.

Положительным считают образец со значением ОП, превышающим $1,15 \times \text{ОП}_{\text{крит}}$.

Отрицательным считают образец со значением ОП менее $0,85 \times \text{ОП}_{\text{крит.}}$

При получении положительного результата с сыворотками в разведении 1:5, при необходимости, провести их дальнейшее титрование путем последовательных двукратных разведений в РБР-С.

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

Пациентам с сомнительными и положительными результатами рекомендуется дополнительное обследование (выявление возбудителя, обследование парных сывороток). Все клинические и лабораторные данные должны быть рассмотрены в совокупности.

Положительным считают образец со значением ОП, превышающим ОП критическое (ОПкрит.).

Отрицательным считают образец со значением ОП менее ОПкрит.

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Набор реагентов «Микоплазмоз-IgG-антитела» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2 - 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

Срок годности набора реагентов 12 мес. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит

Транспортирование производить при температуре 2 - 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С в течение 5 сут. На дальние расстояния только авиатранспортом.

По вопросам, касающимся качества набора «Микоплазмоз-IgG-антитела», следует обращаться в ООО «ИмДи-спектр» по адресу:
630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-он, п. Кольцово, д.2а;
тел/факс (383) 336-76-23

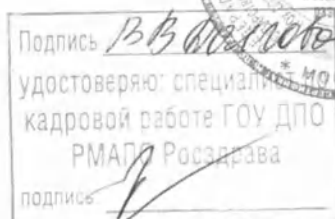
Начальник производства
ООО «ИмДи-спектр»

 В.Г. Майданюк
« » 20 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»

_____ д.м.н., профессор В.В. Долгов
« 17 » сентября 20 10 г.



Пронумеровано,
прошнуровано и опечатано
6 листов

Директор
ООО «ИмДи-спектр»
« 01 » декабря 20 10 г.

