

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«22»

августа

2024 г.

М.П.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления

иммуноглобулинов класса G к антигенам *Ureaplasma urealyticum*

«*Ureaplasma urealyticum* – IgG – ИФА – БЕСТ»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G (IgG) к антигенам *Ureaplasma urealyticum* 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 основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантных антигенов. Во время первой инкубации, при наличии в исследуемых образцах иммуноглобулинов класса G к антигенам *Ureaplasma urealyticum*, происходит их связывание с иммобилизованными на поверхности лунок планшета рекомбинантными антигенами *Ureaplasma urealyticum*. Не связавшийся материал удаляют отмывкой.

На второй стадии антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена (конъюгат), связываются с комплексом «антиген-антитело». Не связавшийся конъюгат удаляют отмывкой.

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

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

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и начальником отделения ИФА бактериальных инфекций

620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце иммуноглобулинов класса G к антигенам *Ureaplasma urealyticum*.

После измерения ОП раствора в лунках на основании рассчитанного критического значения ОП ($ОП_{крит}$) анализируемые образцы оцениваются как положительные, сомнительные или отрицательные.

2.2. Состав набора.

Компонент набора (сокращение) описание	Кол-во
Планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами <i>Ureaplasma urealyticum</i>	1 шт.
Положительный контрольный образец (K^+) Содержит иммуноглобулины класса G к антигенам <i>Ureaplasma urealyticum</i> . Содержит натрия азид (0,1%).	1 фл., 0,5 мл
Отрицательный контрольный образец (K^-) Не содержит иммуноглобулины класса G к антигенам <i>Ureaplasma urealyticum</i> . Содержит натрия азид (0,1%).	1 фл., 1 мл
Конъюгат Антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена. Содержит мертиолят натрия (0,01%).	1 фл. лиофилизированный
Раствор для предварительного разведения (РПР) Содержит фенол (0,15%).	1 фл., 3 мл
Раствор для разведения конъюгата (РК) Содержит фенол (0,125%).	1 фл., 13 мл
Разводящий буфер для сывороток (РБС) Содержит натрия азид (0,1%).	1 фл., 13 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) Содержит ProClin 300 (0,25%).	1 фл., 28 мл
Раствор тетраметилбензидина (Раствор ТМБ) Содержит 3,3',5,5' – тетраметилбензидин (0,025%).	1 фл., 13 мл
Стоп-реагент Содержит кислоту серную (4,9%).	1 фл., 12 мл
Плёнка для заклеивания планшета	3 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.
Наконечники для дозаторов	16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса G к антигенам *Ureaplasma urealyticum* должен соответствовать требованиям СПП 05-2-107 / стандартной панели предприятия (СПП 05-2-107), включающей образцы сывороток, содержащие специфические IgG к антигенам *Ureaplasma urealyticum*: чувствительность по иммуноглобулинам класса G к антигенам *Ureaplasma urealyticum* – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса G к антигенам *Ureaplasma urealyticum* должен соответствовать требованиям СПП 05-2-107 / стандартной панели предприятия (СПП 05-2-107), включающей образцы сывороток, не содержащие IgG к антигенам *Ureaplasma urealyticum*: специфичность по иммуноглобулинам класса G к антигенам *Ureaplasma urealyticum* – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды. Некоторые компоненты содержат ProClin 300, фенол, натрия мертиолят, натрия азид, кислоту серную, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2.

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми и контрольным образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- дозатор полуавтоматический многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкостей от 5 до 300 мкл;
- промывочное устройство для планшета;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Допускается использование образцов, хранившихся при $(2-8)^\circ\text{C}$ не более 5 суток, либо при минус $(20 \pm 3)^\circ\text{C}$, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15 минут 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 при температуре $(18-25)^\circ\text{C}$ не менее 30 минут.

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

Лиофилизированные компоненты должны быть восстановлены, как минимум, за 15 минут 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 ТМБ готов для использования. Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

При промывке лунки (стрипа, планшета) заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через края лунок, и не касаясь лунок наконечником дозатора. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 секунд.

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, раствор ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

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.

Дозаторы 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 объема или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

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

7.2.2. Контрольные образцы

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

Хранение: при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

7.2.3. Растворы конъюгата

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

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

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

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

Тщательно взболтать содержимое флакона с РК, не допуская вспенивания.

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

$\alpha^* =$ _____ мкл

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).

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.), концентрированный раствор конъюгата (п. 7.2.3.).

Внимание! Концентрированный раствор конъюгата должен быть приготовлен, как минимум, за 15 минут 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 минут раствор аккуратно удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором.

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

7.3.3. Во все лунки стрипов внести по 80 мкл РБС. В одну лунку внести 20 мкл K^+ , в две другие лунки по 20 мкл K^- , в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов, получая таким образом, разведение 1:5. Внесение образцов должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз). Лунки заклеить пленкой и инкубировать при температуре (37±1) °С 30 минут.

За 5 минут 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 секунд.

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 при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 30 минут.

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

7.3.7. Остановить реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты измерить 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 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 ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом не более 0,25 ($\text{ОП}_{\text{ср}}\text{K}^- \leq 0,25$);
- значение ОП в лунке с положительным контрольным образцом не менее 0,6 ($\text{ОП}\text{K}^+ \geq 0,60$).

Вычислить критическое значение оптической плотности ($\text{ОП}_{\text{крит}}$) по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}}(\text{K}^-) + 0,25$$

где $\text{ОП}_{\text{ср}}(\text{K}^-)$ – среднее значение ОП для отрицательного контрольного образца.

Исследуемый образец оценить как:

- отрицательный, т.е. не содержащий IgG к антигенам *Ureaplasma urealyticum*, если полученное для него значение $\text{ОП}_{\text{обр}} \leq 0 \text{ ОП}_{\text{крит}} - 0,05$;

– положительный, т.е. содержащий IgG к антигенам *Ureaplasma urealyticum*, если значение $ОП_{обр} \geq ОП_{крит} + 0,05$;

– сомнительный, если $ОП_{крит} - 0,05 < ОП_{обр} < ОП_{крит} + 0,05$.

9.2. Интерпретация результатов

Оптическая плотность образца	Результат	Титр IgG
от 0 до ($ОП_{крит} - 0,05$)	отрицательный	–
от ($ОП_{крит} - 0,05$) до ($ОП_{крит} + 0,05$)	сомнительный	–
от ($ОП_{крит} + 0,05$) до $1,5 \times ОП_{крит}$	слабоположительный	1:5
от $1,5 \times ОП_{крит}$ до $2 \times ОП_{крит}$	положительный	1:10
от $2 \times ОП_{крит}$ до $3 \times ОП_{крит}$	сильноположительный	1:20
от $3 \times ОП_{крит}$ до $4 \times ОП_{крит}$	сильноположительный	1:40
более $4 \times ОП_{крит}$	сильноположительный	1:80

Пациентам с сомнительными и положительными результатами рекомендуется дополнительное обследование (выявление возбудителя, обследование парных сывороток). 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 «*Ureaplasma urealyticum* – IgG – ИФА – БЕСТ» обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

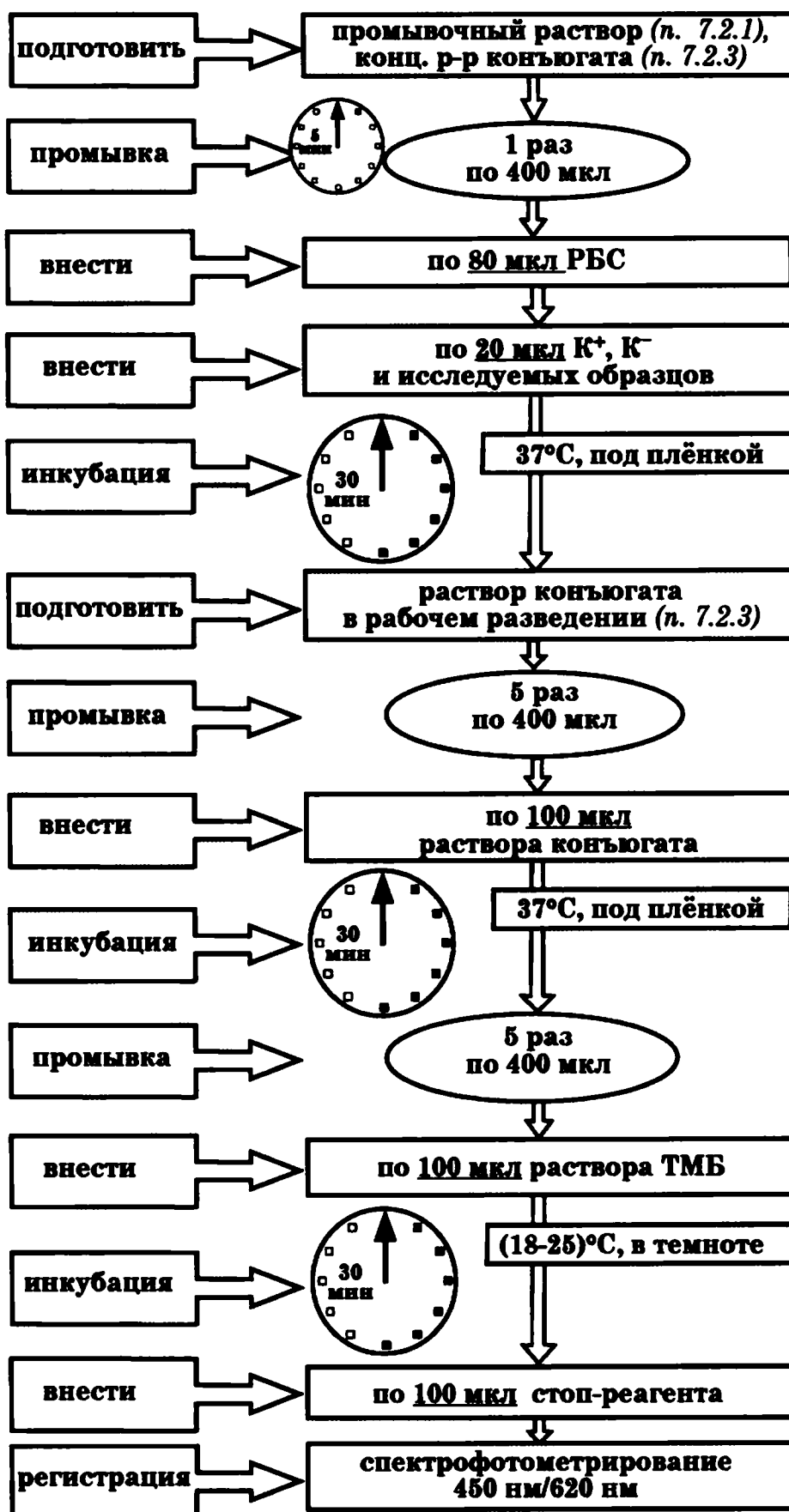
630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383): 252-51-62, 227-60-30;

тел./факс (383): 252-51-81, 252-51-77;

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Схема анализа



ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

Символ	Описание	Символ	Описание
	Номер по каталогу		Осторожно!
	Содержимого достаточно для проведения n тестов		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Код партии		Предел температуры
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до		Обратитесь к инструкции по применению
YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате: Год-Месяц-День Год-Месяц		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-69

Нач. отделения
ИФА бактериальных инфекций
АО «Вектор-Бест»



Т.Г. Дворянчикова

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 11 листов.
Директор по технологии и качеству
АО «Вектор-Бест»



Масяго А.В.
«21» 02 20 24 г.