

ref. № 187a/24
19.11.2024

STATEMENT

We, **Vitrotest Bioreagent LLC** having a registered office at M.Boychuka 18b, of.56, Kyiv 01103 Ukraine assign SRL Sanmedico, having a registered office at A. Corobceanu street 7A, apt. 9, Chişinău MD-2012, Moldova, as authorized representative in Republic of Moldova.

We declare that the company mentioned above is authorized to register, notify, renew or modify the registration of medical devices on the territory of the Republic of Moldova.

Ihor Nikolaienko, Ph.D. _____
Director, Vitrotest Bioreagent LLC





СЕРТИФІКАТ

CERTIFICATE * CERTIFICAT * ZERTIFIKAT * СЕРТИФИКАТ * CERTIFICADO

ОРГАН СЕРТИФІКАЦІЇ СИСТЕМ УПРАВЛІННЯ
ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»
ЗАСВІДЧУЄ, ЩО

СИСТЕМА УПРАВЛІННЯ ЯКІСТЮ

ТОВАРИСТВА З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «ВІТРОТЕСТ БІОРЕАГЕНТ»

Юридична адреса: вул. Бойчука, 18-Б, кв. 56, м. Київ,
01103, Україна
Адреса виробництва: вул. Курортна, 11, м. Київ, 04075, Україна

код ЄДРПОУ 42149820

СТОСОВНО
розроблення та виробництва тест-систем імуноферментних

**ВІДПОВІДАЄ ВИМОГАМ
ДСТУ EN ISO 13485:2018
(EN ISO 13485:2016, IDT; ISO 13485:2016, IDT)**

Сертифікат № UA.C.378–19 в Реєстрі Органу сертифікації
zareєстрований " 25 " листопада 2019 року
чинний до " 24 " листопада 2022 року

Заступник керівника
Органу сертифікації



В.Д. Ример



ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО «ВСЬУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР
СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ»
(ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»)

вул. Метрологічна, 4, м. Київ, 03143, Україна, тел./факс +38 044 452-67-38
Атестат акредитації НААУ № 80020

№ 80020
ДСТУ EN ISO/IEC 17021-1

Чинність сертифікату можна перевірити на сайті www.certsystems.kiev.ua в розділі
«Послуги / Сертифікація систем управління»

Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgG

Иммуноферментная тест-система для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к *Mycoplasma hominis*

**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Иммуноферментная тест-система Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgG предназначена для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к *Mycoplasma hominis* в сыворотке или плазме крови человека.

Тест-набор может быть применен как для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием автоматических пипеток и стандартного оборудования, так и для поставки на автоматическом иммуноферментном анализаторе открытого типа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Микоплазмы являются условными патогенами, поскольку их часто обнаруживают в составе нормальной микрофлоры человека. Вместе с тем эти микроорганизмы могут быть вовлечены в воспалительный процесс при урогенитальных заболеваниях. Данные о частоте распространения микоплазм среди населения разных стран противоречивые, а показатели инфицированности варьируют от 10 до 80 %.

Mycoplasma hominis инфицирует преимущественно органы мочеполовой системы и вызывает различные деструктивно-воспалительные процессы. У мужчин *M. hominis* обычно вызывает уретрит и простатит, а у женщин - уретрит, цервицит и воспалительные поражения тазовых органов. Особую опасность представляет урогенитальный микоплазмоз беременных, поскольку может вызвать невынашивание, преждевременные роды, инфицирование плода и развитие постродового сепсиса.

Клинические проявления, обусловленные присутствием *M. hominis*, часто схожи с симптомами других заболеваний урогенитального тракта бактериальной, вирусной и других этиологий. Поэтому для успешной диагностики урогенитального микоплазмоза обязательно проводят лабораторные исследования, которые позволяют дифференцировать их.

К серологическим методам диагностики микоплазмоза относятся реакции преципитации и иммунофлуоресценции. Для выявления сывороточных антител к *M. hominis* используют реакцию пассивной гемагглютинации и иммуноферментный анализ, позволяющий определить стадию и характер течения болезни. Это особенно важно при хроническом течении заболевания в течение многих месяцев и лет. Наличие антител класса IgG к *M. hominis* отражает общую картину иммунного ответа вследствие длительной или перенесенной инфекции. В последнем случае IgG могут проявляться на низком уровне в течение многих лет.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Выявление антител класса IgG, специфических к *Mycoplasma hominis*, в тест-системе Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgG базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбованы рекомбинантные антигены *M. hominis*. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета происходит связывание, при наличии в образцах, специфических к *M. hominis* антител с антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется конъюгат антивидовых анти-IgG моноклональных антител с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Комплексы антиген-антитело выявляются путем добавления раствора хромогена 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 15 мин инкубации реакция останавливается добавлением стоп-реагента. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 нм. Значение ОП, полученное для образца, позволяет выявить наличие или отсутствие антител класса IgG к *M. hominis*. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**4.1. Состав набора**

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">ELISA STRIPS</div>	1х96 лунок	ИФА-планшет В каждой лунке планшета засорбованы рекомбинантные антигены <i>Mycoplasma hominis</i> . Лунки можно отделять. 12 стрипов по 8 лунок.
---	---------------	--

CONTROL +	1x0,5 ml	Положительный контроль Раствор специфических моноклональных антител с консервантом (розовый).
CONTROL -	1x1,0 ml	Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x10 ml	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (фиолетовый).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Раствор конъюгата Буферный раствор моноклональных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зеленый), готовый к использованию.
TMB SOLUTION	1x12 ml	Раствор ТМБ Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный), готовый к использованию.
WASH TWEEN 20X	1x50 ml	Раствор для промывания Tw20 (20x) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x12 ml	Стоп-реагент Раствор 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (бесцветный), готовый к использованию.

Клейкая пленка (2), бланк внесения проб (1), инструкция по применению и сертификат качества.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

- Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники к ним;
- спектрофотометр (ридер) для микропланшетов на 450/620-695 nm;
- мерная лабораторная посуда (10-1000 ml);
- деионизированная или дистиллированная вода;
- термостат на 37 °C;
- автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер);
- контейнеры для отходов потенциально зараженного материала;
- таймер;
- фильтровальная бумага;
- одноразовые перчатки;
- дезинфицирующие средства;
- защитная одежда.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Предостережения

Соблюдение времени инкубации и температуры является чрезвычайно важным для корректного результата ИФА.

- не использовать компоненты тест-системы после окончания срока годности;
- не использовать при анализе и не смешивать компоненты разных серий, компоненты с тест-систем различных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с наборами Vitrotest®;

*Примечание: допускается использование **WASH TWEEN 20X**, **TMB SOLUTION** и **STOP SOLUTION** других серий.*

- после использования реагента закрывать каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролировать наполнение и полную аспирацию раствора из лунки;
- каждый раз использовать новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегать попадания прямых солнечных лучей на реагенты тест-системы;
- **TMB SOLUTION** должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен

в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегать контакта **TMB SOLUTION** с металлами или ионами металлов. Для работы использовать только чистый, тщательно выполосканное дистиллированной водой посуду;

- ни в коем случае не использовать одну и ту же посуду для **CONJUGATE SOLUTION** и **TMB SOLUTION**.

Производитель не несет ответственности за любые некорректные результаты и неблагоприятные случаи, возникшие вследствие нарушений вышеуказанных предостережений. Производитель не несет ответственности за визуальный учет результатов анализа (без использования спектрофотометра).

5.2. Меры безопасности

- все реагенты набора предназначены только для *in vitro* диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в защитной одежде, одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный и отрицательный контроли тест-системы Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgG не содержат компонентов человеческого происхождения;
- некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании **TMB SOLUTION**, **STOP SOLUTION** и **CONJUGATE SOLUTION** на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, необходимо обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В случае разбрызгивания кислоты, содержащуюся на поверхности кислоту сначала нужно нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность как описано выше.

5.3. Утилизация отходов

- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6 % в течение 3 h при комнатной температуре, или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5 % в течение 30 min, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121 °C в течение 1h;
- не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- удаление инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством;
- удаление остальных компонентов тест-систем после использования проводить согласно GLP (good laboratory practice) и действующего национального законодательства в сфере обращения с отходами.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагенты тест-системы стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, если их хранить при температуре 2-8 °C. Не допускается замораживание тест-системы. Транспортировать набор при температуре 2-8 °C. Допускается однократная транспортировка при температуре не выше 23 °C в течение двух дней.

После вскрытия первичной упаковки компоненты тест-системы являются стабильными в течение 3 месяцев, кроме тех, которые указаны в п. 8 настоящей Инструкции.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцы сыворотки или плазмы крови (EDTA, литий-гепарин, цитрат натрия, фторид калия) хранить при температуре 2-8 °C не более 3 дней после забора. Для более длительного хранения образцы хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -70 °C. Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 min. Не использовать прогретые образцы. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освободить образец от нерастворимых включений центрифугированием при 3000 оборотов/min в течение 10-15 min. Не использовать образцы сывороток (или плазмы) с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным прорастанием. На результаты анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,21 mg/ml (361,8 µmol/l), гемоглобина в концентрации до 10 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Очень важно выдержать все реагенты тест-системы при комнатной температуре 18-25 °C в течение 30 min перед использованием!

8.1. Подготовка ИФА-планшета

[ELISA STRIPS] упакован под вакуумом с влагопоглотителем.

Для предупреждения конденсации воды в лунках следует открывать [ELISA STRIPS] только после выдержки 30 min при комнатной температуре. Затем раскрыть вакуумную упаковку, отделить необходимое количество лунок, а остальные сразу же тщательно упаковать с влагопоглотителем и **хранить плотно закрытыми на замок (zip-lock)** при температуре 2-8 °C. Хранение планшета таким способом обеспечивает его стабильность в течение 3 месяцев.

8.2. Приготовление раствора для промывания

Для приготовления раствора для промывания развести концентрат [WASH TWEEN]20X 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, затем перемешать. Например, 4 ml концентрата + 76 ml воды, достаточно для 8 лунок. В случае наличия кристаллов в концентрате раствора для промывания прогреть флакон при температуре 37 °C до полного растворения кристаллов (15 - 20 min). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8 °C не более 7 дней.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
- 9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункту 8.2 данной Инструкции.
- 9.4. Внести во все лунки планшета по 80 µl [SAMPLE DILUENT].
- 9.5. Внести в лунки по 20 µl контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – [CONTROL +], в лунки B1, C1 и D1 – [CONTROL -], в остальные лунки – исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования, происходит изменение цвета раствора в лунках с фиолетового на синий.
- 9.6. Заклеить стрипы клейкой плёнкой и инкубировать на протяжении 30 min при температуре 37 °C.
- 9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее по 300 µl раствором для промывания, оставить не менее чем на 30 s;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 µl;
 - повторить процедуру промывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишнего влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. В лунки внести по 100 µl [CONJUGATE SOLUTION]. Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 min при температуре 37 °C.
- 9.9. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в п. 9.7 данной инструкции.
- 9.10. Не дотрагиваясь до дна и стенок лунок планшета, внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в лунки.
- 9.11. Инкубировать стрипы на протяжении 15 min в темном месте при комнатной температуре 18-25 °C. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
- 9.12. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 µl [STOP SOLUTION], придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [TMB SOLUTION].
- 9.13. Измерять на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm на протяжении 5 min после остановки реакции. До проведения измерения следует убедиться в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае следует оставить лунку для установления бланка (в такую лунку внести только [TMB SOLUTION] и [STOP SOLUTION]).

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Рассчитать среднее значение ОП отрицательного контроля (Nc), уровень граничного значения (Cut off - CO) и индекс позитивности образца (IP_{sample}):

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3;$$

$$CO = Nc + 0,25;$$

$$IP_{\text{sample}} = OD_{\text{sample}} / CO,$$

где OD_{sample} – оптическая плотность образца

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

CONTROL +	ОП $\geq 1,2$
CONTROL -	ОП $\leq 0,15$

10.3. Интерпретация результатов

$IP_{\text{sample}} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ*
$IP_{\text{sample}} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

*Неопределенные образцы рекомендуется исследовать повторно. Если результаты снова будут в рамках «неопределенных», следует провести отбор нового образца.

Использование индекса позитивности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических антител в динамике в парных образцах, полученных от пациентов с интервалом в 2-4 недели.

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

Для оценки чувствительности тест-системы были проанализированы 33 образца сывороток крови, положительных в двух аналогичных коммерческих тест-системах. Относительная чувствительность тест-системы Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgG при этом составляла 97,0%.

В сравнительных исследованиях тест-системы Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgG с другой коммерческой тест-системой были проанализированы 84 образца сывороток крови людей. При этом относительная специфичность набора составила 97,6%.

11.2. Точность

Повторяемость результатов в пределах одной постановки анализа (Intra assay repeatability)

Коэффициент вариации (CV) для двух образцов с различным уровнем специфических антител оценивали в 32 повторах на одной серии тест-системы.

№ образца	IP_{cp}	CV, %
29s	1,77	6,2
54s	10,11	5,1

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

Коэффициент вариации (CV) для двух образцов с различным уровнем специфических антител оценивали в течение четырех дней в четырех постановках анализа по 8 повторов в каждом анализе.

№ образца	IP_{cp}	CV, %
29s	1,80	6,5
54s	10,10	5,4

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Положительный результат в тест-системе Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgG свидетельствует о наличии у пациента антител класса IgG, специфических к *M.hominis*, продуцируемых организмом при инфицировании этим возбудителем.

Отсутствие антител класса IgG, специфических к *M.hominis*, не исключает наличия инфекции, вызванной *M.hominis*. Определение специфических к *M.hominis* антител в иммуноферментном анализе особенно информативно при длительной и восходящей инфекции.

Для постановки диагноза следует учитывать как результаты комплексных лабораторных исследований (серологические и прямые методы диагностики), так и клинические проявления заболевания.

13. ПРОБЛЕМЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА, И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

<i>Возможные причины</i>	<i>Способы устранения проблем</i>
<i>Высокий фон в лунках всего планшета</i>	
Загрязненный промыватель	Почистить головку промывателя и промыть 30 % раствором этилового спирта, затем дистиллированной водой
Низкое качество или загрязнения воды	Использовать очищенную воду с удельным сопротивлением $\geq 10 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$.
Использование плохо вымытой посуды	Использовать химически чистую посуду
Использование дезинфицирующих средств, содержащих хлор	Не использовать хлорсодержащие дезинфицирующие средства
Использование загрязненных наконечников	Использовать новые наконечники
Увеличено время инкубации или изменен температурный режим	Соблюдать режим инкубации в соответствии с инструкцией по применению
<i>Высокий фон в отдельных рядах</i>	
Повторное внесение раствора ТМБ	Раствор ТМБ вносить один раз
Загрязнение конуса автоматической пипетки раствором конъюгата	Прочистить пипетку и осторожно набирать жидкость
Загрязнен один из каналов промывателя	Почистить канал промывателя, промыть вошер
<i>Значения ОП положительного контроля ниже установленной границы</i>	
Неправильно внесен или отсутствует один из реагентов (конъюгат или раствор ТМБ)	Повторно провести ИФА, обратить внимание на правильность внесения этих реагентов
Сокращено время инкубации на одном из этапов	Проводить инкубацию в соответствии с инструкцией по применению
<i>Интенсивность окраски лунок не соответствует полученной оптической плотности</i>	
Смещен оптический луч	Проверить корректность работы ридера

ЛИТЕРАТУРА

1. Микоплазмы // Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Позеев – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – С. 517-528.
2. Тейлор-Робинсон Л., Рентон А. Какие тесты для диагностики инфекции, передаваемых половым путем, следует использовать в индустриально развитых странах // Заболевания, передаваемые по-ловым путем. – 1998. - №5. – С. 23-26.
3. Дяченко В.Ф., Бірюкова С.В., Старобінець З.Г. Лабораторна діагностика гнійно-запальних захворювань, обумовлених аспорогенними мікроорганізмами: Методичні рекомендації. – Харків, 2000. – 35 с.
4. Уніфікація лабораторних методів дослідження в діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом / Укладачі І.І.Мавров, О.П.Белозеров, Л.С. Тацька. – Харків: Факт, 2000. – 120 с.

ГРАФИЧЕСКИЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Номер по каталогу
	Используйте инструкцию по применению
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Производитель
	Предупреждение
	Достаточно для проведения <n> количества исследований
	Ограничение температуры
	Код партии
	Использовать до
	Дата производства
	Беречь от прямых солнечных лучей
	Знак соответствия техническим регламентам

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_Mycoplasma hominis IgG_TK024_V05_RU
Редакция Инструкции № 5 от 26.07.2023 г.

По вопросам и пожеланиями относительно работы изделия обращайтесь к производителю:



ООО «Витротест Биореагент»,
ул. М. Бойчука 18 б, оф. 56, г. Киев, 01103, Украина (юридический адрес)
ул. Курортная, дом. 11, г. Киев, 04075, Украина (местонахождение производства)

тел.: +38 (044) 222-76-72, +38 (097) 222-76-72
e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgG

СХЕМА АНАЛИЗА



Выдержать все реагенты и образцы минимум 30 min при 18-25 °С перед использованием



Внести 80 µl [SAMPLE DILUENT] в лунки стрипов (фиолетовый)



Внести 20 µl контролей и образцов в лунки:

A1 – [CONTROL +],

B1, C1, D1 – [CONTROL -],

E1 и в другие лунки – исследуемые образцы

(цвет изменится с фиолетового на синий)



Накрыть стрипы клейкой пленкой и инкубировать 30 min при 37 °С



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 по 300 µl в лунку с 30 s замачиванием



Добавить 100µl [CONJUGATE SOLUTION] в каждую лунку (зеленый цвет)



Заклеить стрипы новой клейкой пленкой и инкубировать 30 min при 37 °С



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 по 300 µl в лунку с 30 s замачиванием



Внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в каждую лунку



Инкубировать стрипы 15 min в темноте при 18-25 °С без клейкой пленки



Остановить реакцию добавлением 100 µl [STOP SOLUTION] (цвет меняется с синего на желтый)



Определить оптическую плотность (OD) при 450/620-695 nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3; \quad CO = Nc + 0,25;$$
$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO;$$

Nc - среднее значение ОП 3 [CONTROL -],

CO - граничное значение, IP- индекс позитивности

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$IP_{sample} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ
$IP_{sample} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgM

Иммуноферментная тест-система для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM к *Mycoplasma hominis*

**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Иммуноферментная тест-система Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgM предназначена для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM к *Mycoplasma hominis* в сыворотке или плазме крови человека.

Тест-набор может быть применен как для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием автоматических пипеток и стандартного оборудования, так и для постановки на автоматическом иммуноферментном анализаторе открытого типа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Микоплазмы являются условными патогенами, поскольку их часто обнаруживают в составе нормальной микрофлоры человека. Вместе с тем эти микроорганизмы могут быть вовлечены в воспалительный процесс при урогенитальных заболеваниях. Данные о частоте распространения микоплазм среди населения разных стран противоречивые, а показатели инфицированности варьируют от 10 до 80 %.

Mycoplasma hominis инфицирует преимущественно органы мочеполовой системы и вызывает различные деструктивно-воспалительные процессы. У мужчин *M. hominis* обычно вызывает уретрит и простатит, а у женщин - уретрит, цервицит и воспалительные поражения тазовых органов. Особую опасность представляет урогенитальный микоплазмоз беременных, поскольку может вызвать невынашивание, преждевременные роды, инфицирование плода и развитие постродового сепсиса.

Клинические проявления, обусловленные присутствием *M. hominis*, часто схожи с симптомами других заболеваний урогенитального тракта бактериальной, вирусной и других этиологий. Поэтому для успешной диагностики урогенитального микоплазмоза обязательно проводят лабораторные исследования, которые позволяют дифференцировать их.

К серологическим методам диагностики микоплазмоза относятся реакции преципитации и иммунофлуоресценции. Для выявления сывороточных антител к *M. hominis* используют реакцию пассивной гемагглютинации и иммуноферментный анализ, позволяющий определить стадию и характер течения болезни.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Определение антител класса IgM, специфических к *Mycoplasma hominis*, в тест-системе Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgM базируется на принципе «IgM-захвата» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы моноклональные антитела, специфические к иммуноглобулинам класса М человека. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета иммуноглобулины класса М связываются с моноклональными антителами на твердой фазе. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляется конъюгат рекомбинантного антигена *M. hominis* с пероксидазой хрена, который связывается со специфическими IgM в составе образованных иммунных комплексов на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Иммунные комплексы выявляются добавлением раствора хромогена 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30 мин инкубации реакция останавливается и оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**4.1. Состав набора**

	1x96 лунок	ИФА-планшет В каждой лунке планшета засорбированы моноклональные антитела, специфические к иммуноглобулинам класса М человека. Лунки можно отделять. 12 стрипов по 8 лунок.
--	---------------	--

CONTROL +	1x0,5 ml	Положительный контроль Раствор иммуноглобулинов с консервантом (розовый).
CONTROL -	1x0,5 ml	Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (фиолетовый).
CONJUGATE DILUENT	1x13 ml	Раствор для разведения конъюгата Буферный раствор с детергентом и консервантом (желтый).
CONJUGATE 11x	1x1,3 ml	Конъюгат (11x) 11-ти кратный концентрат конъюгата рекомбинантного антигена <i>M. hominis</i> с пероксидазой хрена в буферном растворе со стабилизаторами (синий).
TMB SOLUTION	1x12 ml	Раствор ТМБ Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный), готовый к использованию.
WASH TWEEN 20x	1x50 ml	Раствор для промывания Tw20 (20x) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x12 ml	Стоп-реагент Раствор 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (бесцветный), готовый к использованию.

Клейкая пленка (2), бланк внесения проб (1), инструкция по применению и сертификат качества.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

- Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники к ним;
- спектрофотометр (ридер) для микропланшетов на 450/620-695 nm;
- мерная лабораторная посуда (10-1000 ml);
- деионизированная или дистиллированная вода;
- термостат на 37 °C;
- автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер);
- контейнеры для отходов потенциально зараженного материала;
- таймер;
- фильтровальная бумага;
- одноразовые перчатки;
- дезинфицирующие средства;
- защитная одежда.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Предостережения

Соблюдение времени инкубации и температуры является чрезвычайно важным для корректного результата ИФА.

- не использовать компоненты тест-системы после окончания срока годности;
- не использовать при анализе и не смешивать компоненты разных серий, компоненты с тест-систем различных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с наборами Vitrotest®;

*Примечание: допускается использование **WASH TWEEN 20x**, **TMB SOLUTION** и **STOP SOLUTION** других серий.*

- после использования реагента закрывать каждый флакон своей крышечкой;
- во время промывания контролировать наполнение и полную аспирацию раствора из лунки;
- каждый раз использовать новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;

- избегать попадания прямых солнечных лучей на реагенты тест-системы;
- **TMB SOLUTION** должен быть бесцветным перед использованием. Если **раствор окрашен** в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегать контакта **TMB SOLUTION** с металлами или ионами металлов. Для работы использовать только чистый, тщательно выполосканное дистиллированной водой посуду;
- **ни в коем случае** не использовать одну и ту же посуду для раствора конъюгата и **TMB SOLUTION**.

Производитель не несет ответственности за любые некорректные результаты и неблагоприятные случаи, возникшие вследствие нарушений вышеуказанных предостережений. Производитель не несет ответственности за визуальный учет результатов анализа (без использования спектрофотометра).

5.2. Меры безопасности

- все реагенты набора предназначены только для *in vitro* диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в защитной одежде, одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный и отрицательный контроли тест-системы Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgM не содержат компонентов человеческого происхождения;
- некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации **вредных веществ** и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании **TMB SOLUTION** **STOP SOLUTION** и раствора конъюгата на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, необходимо обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В случае разбрызгивания кислоты, содержащуюся на поверхности кислоту сначала нужно нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность как описано выше.

5.3. Утилизация отходов

- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6 % в течение 3 h при комнатной температуре, или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5 % в течение 30 min, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121 °C в течение 1 h;
- не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- удаление инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством;
- удаление остальных компонентов тест-систем после использования проводить согласно GLP (good laboratory practice) и действующего национального законодательства в сфере обращения с отходами.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагенты тест-системы стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, если их хранить при температуре 2-8 °C. Не допускается замораживание тест-системы. Транспортировать набор при температуре 2-8 °C. Допускается однократная транспортировка при температуре не выше 23 °C в течение двух дней.

После вскрытия первичной упаковки компоненты тест-системы являются стабильными в течение 3 месяцев, кроме тех, которые указаны в п. 8 настоящей Инструкции.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцы сыворотки или плазмы крови (EDTA, литий-гепарин, цитрат натрия) хранить при температуре 2-8 °C не более 3 дней после забора. Для более длительного хранения образцы хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -70 °C. Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 min. Не использовать прогретые образцы. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освободить образец от нерастворимых включений центрифугированием при 3000 оборотов/min в течение 10-15 min. Не использовать образцы сывороток (или плазмы) с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным прорастанием. На результаты анализа не влияет

присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,21 mg/ml (361,8 μmol/l), гемоглобина в концентрации до 10 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Очень важно выдержать все реагенты тест-системы при комнатной температуре 18-25 °C в течение 30 min перед использованием!

8.1. Подготовка ИФА-планшета

[ELISA STRIPS] упакован под вакуумом с влагопоглотителем.

Для предупреждения конденсации воды в лунках следует открывать [ELISA STRIPS] только после выдержки 30 min при комнатной температуре. Затем раскрыть вакуумную упаковку, отделить необходимое количество лунок, а остальные сразу же тщательно упаковать с влагопоглотителем и **хранить плотно закрытыми на замок (zip-lock)** при температуре 2-8 °C. Хранение планшетов таким способом обеспечивает его стабильность в течение 3 месяцев.

8.2. Приготовление раствора для промывания

Для приготовления раствора для промывания развести концентрат [WASH TWEEN] 20X 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, затем перемешать. Например, 4 ml концентрата + 76 ml воды, достаточно для 8 лунок. В случае наличия кристаллов в концентрате раствора для промывания прогреть флакон при температуре 37 °C до полного растворения кристаллов (15 - 20 min). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8 °C не более 7 дней.

8.3. Приготовление раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата готовится следующим образом:

Развести [CONJUGATE] 11X (синий) в чистом флаконе [CONJUGATE DILUENT] (желтый) в соотношении 1:11 (то есть, 1+10), раствор окрашивается в зеленый цвет. Например, для 8 лунок анализа добавить в 1 ml [CONJUGATE DILUENT] 100 μl [CONJUGATE] 11X.

Раствор конъюгата в рабочем разведении стабилен в течение суток при условии хранения при 2-8 °C.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
- 9.3. Приготовить раствор для промывания **согласно пункту 8.2** данной Инструкции.
- 9.4. Внести во все лунки планшета по 90 μl [SAMPLE DILUENT].
- 9.5. Внести в лунки по 10 μl контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – [CONTROL] +, в лунки B1, C1 и D1 – [CONTROL] -, в остальные лунки – исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования, происходит изменение цвета раствора в лунках с фиолетового на синий.
Отбор, внесение и пипетирование [CONTROL] + проводить с особой тщательностью.
- 9.6. Заклеить стрипы клейкой плёнкой и инкубировать на протяжении 30 min при температуре 37 °C.
- 9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее по 300 μl раствором для промывания, оставить не менее чем на 30 s;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 μl;
 - повторить процедуру промывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишнего влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. Приготовить раствор конъюгата согласно пункта 8.3.
- 9.9. В лунки внести по 100 μl раствора конъюгата (в рабочем разведении 1:11). Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 min при 37 °C.
- 9.10. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в п. 9.7 данной инструкции.
- 9.11. Не дотрагиваясь до дна и стенок лунок планшета, внести по 100 μl [TMB SOLUTION] в лунки.
- 9.12. Инкубировать стрипы на протяжении 30 min в темном месте при комнатной температуре 18-25 °C. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
- 9.13. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 μl [STOP SOLUTION], при-

9.14. Измерять на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 нм на протяжениии 5 min после остановки реакции. До проведения измерения следует убедиться в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 нм, в этом случае следует оставить лунку для установления бланка (в такую лунку вносить только [TMB SOLUTION] и [STOP SOLUTION]).

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Рассчитать среднее значение ОП отрицательного контроля (Nc), уровень граничного значения (Cut off - CO) и индекс позитивности образца (IP_{sample}):

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3;$$

$$CO = Nc + 0,25;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO,$$

где OD_{sample} – оптическая плотность образца

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

[CONTROL +]	ОГ ≥ 1,2
[CONTROL -]	ОГ ≤ 0,15

10.3. Интерпретация результатов

IP _{sample} > 1,1	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
0,9 ≤ IP _{sample} ≤ 1,1	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ*
IP _{sample} < 0,9	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

*Неопределенные образцы рекомендуется исследовать повторно. Если результаты снова будут в рамках «неопределенных», следует провести отбор нового образца.

Использование индекса позитивности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических антител в динамике в парных образцах, полученных от пациентов с интервалом в 2-4 недели.

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Точность

Повторяемость результатов в пределах одной постановки анализа (Intra assay repeatability)

Коэффициент вариации (CV) для двух образцов с различным уровнем специфических антител оценивали в 32 повторах на одной серии тест-системы.

№ образца	OD _{cp}	IP _{cp}	CV, %
K1	1,470	5,18	4,5
K2	0,821	2,89	7,9

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

Коэффициент вариации (CV) для двух образцов с различным уровнем специфических антител оценивали в течение четырех дней в четырех постановках анализа по 8 повторов в каждом анализе.

№ образца	OD _{cp}	IP _{cp}	CV, %
K1	1,447	5,09	5,2
K2	0,842	2,96	6,3

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Положительный результат в тест-системе Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgM является свидетельством наличия у пациента антител класса IgM, специфических к *M. hominis*, которые продуцируются организмом при инфицировании этим возбудителем.

Следует заметить, что в случае раннего микоплазмоза результат ИФА может быть отрицательным из-за отсутствия антител на начальном этапе заболевания. Поэтому отсутствие антител класса IgM, специфических к *M. hominis*, не исключает наличия микоплазменной инфекции.

Для постановки диагноза следует учитывать как результаты комплексных лабораторных исследований (серологические и прямые методы диагностики), так и клинические проявления заболевания.

13. ПРОБЛЕМЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА, И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

<i>Возможные причины</i>	<i>Способы устранения проблем</i>
<i>Высокий фон в лунках всего планшета</i>	
Загрязненный промыватель	Почистить головку промывателя и промыть 30 % раствором этилового спирта, затем дистиллированной водой
Низкое качество или загрязнения воды	Использовать очищенную воду с удельным сопротивлением ≥ 10 МΩ·см.
Использование плохо вымытой посуды	Использовать химически чистую посуду
Использование дезинфицирующих средств, содержащих хлор	Не использовать хлорсодержащие дезинфицирующие средства
Использование загрязненных наконечников	Использовать новые наконечники
Увеличено время инкубации или изменен температурный режим	Соблюдать режим инкубации в соответствии с инструкцией по применению
<i>Высокий фон в отдельных рядах</i>	
Повторное внесение раствора ТМБ	Раствор ТМБ вносить один раз
Загрязнение конуса автоматической пипетки раствором конъюгата	Прочистить пипетку и осторожно набирать жидкость
Загрязнен один из каналов промывателя	Почистить канал промывателя, промыть вошер
<i>Значения ОП положительного контроля ниже установленной границы</i>	
Неправильно внесен или отсутствует один из реагентов (конъюгат или раствор ТМБ)	Повторно провести ИФА, обратить внимание на правильность внесения этих реагентов
Сокращено время инкубации на одном из этапов	Проводить инкубацию в соответствии с инструкцией по применению
<i>Интенсивность окраски лунок не соответствует полученной оптической плотности</i>	
Смещен оптический луч	Проверить корректность работы ридера

ЛИТЕРАТУРА

1. Микоплазмы // Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Позеев – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – С. 517-528.
2. Тейлор-Робинсон Л., Рентон А. Какие тесты для диагностики инфекции, передаваемых половым путем, следует использовать в индустриально развитых странах // Заболевания, передаваемые по-ловым путем. – 1998. - №5. – С. 23-26.
3. Дяченко В.Ф., Бірюкова С.В., Старобінець З.Г. Лабораторна діагностика гнійно-запальних захворювань, обумовлених аспорогенними мікроорганізмами: Методичні рекомендації. – Харків, 2000. – 35 с.
4. Уніфікація лабораторних методів дослідження в діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом / Укладачі І.І.Мавров, О.П.Белозеров, Л.С. Тацька. – Харків: Факт, 2000. – 120 с.

ГРАФИЧЕСКИЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ



Номер по каталогу



Используйте инструкцию по применению



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Производитель



Предупреждение



Достаточно для проведения <n> количества исследований



Ограничение температуры



Код партии



Использовать до



Дата производства



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_Mycoplasma hominis IgM_TK097_V02_RU

Редакция Инструкции № 2 от 17.08.2022 г.

По вопросам и пожеланиями относительно работы изделия обращайтесь к производителю:



ООО «Витротест Биореагент»,
ул. М. Бойчука 18 б, оф. 56, г. Киев, 01103, Украина (юридический адрес)
ул. Курортная, дом. 11, г. Киев, 04075, Украина (местонахождение производства)

тел.: +38 (044) 222-76-72, +38 (097) 222-76-72
e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



Vitrotest® Mycoplasma hominis-IgM

СХЕМА АНАЛИЗА



Выдержать все реагенты и образцы не менее 30 min при 18-25 °C перед использованием



Внести по 90 µl [SAMPLE DILUENT] в лунки стрипов (фиолетовый цвет)



Внести по 10 µl контролей и образцов в лунки:

A1 – [CONTROL +],

B1, C1, D1 – [CONTROL -],

E1 и остальные лунки – исследуемые образцы (цвет меняется с фиолетового на синий)



Заклеить стрипы клейкой пленкой, инкубировать 30 min при 37 °C



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 по 300 µl в лунку с 30 s замачиванием



Внести по 100 µl раствора конъюгата (в рабочем разведении 1:1) в каждую лунку (зелёный цвет)



Заклеить стрипы новой клейкой пленкой, инкубировать 30 min при 37 °C



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 по 300 µl в лунку с 30 s замачиванием



Внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в каждую лунку



Инкубировать 30 min в тёмном месте при 18-25 °C без клейкой пленки



Остановить реакцию внесением по 100 µl [STOP SOLUTION] (цвет меняется с синего на жёлтый)



Определить оптическую плотность (OD) при 450/620-695 nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3; \quad CO = Nc + 0,25;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO;$$

Nc - среднее значение ОП 3 [CONTROL -],

CO - граничное значение, IP- индекс позитивности

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$IP_{sample} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ
$IP_{sample} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

Vitrotest® Ureaplasma-IgG

Иммуноферментная тест-система для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к *Ureaplasma urealyticum*

TK028
96 анализов

**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Иммуноферментная тест-система Vitrotest® Ureaplasma-IgG предназначена для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к *Ureaplasma urealyticum* в сыворотке или плазме крови человека.

Тест-набор может быть применен как для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием автоматических пипеток и стандартного оборудования, так и для постановки на автоматическом иммуноферментном анализаторе открытого типа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Микроорганизм *Ureaplasma urealyticum* вызывает воспалительные заболевания органов мочеполовой системы человека. Уреаплазмы часто обнаруживают у женщин, больных вагинитом, циститом. Проникновение возбудителя в верхние отделы половой системы может привести к нарушению репродуктивных функций. У мужчин *U.urealyticum* является причиной негонорейного уретрита и простатита (до 50 % случаев). Доказана роль уреаплазм в развитии большинства случаев мочекаменной болезни. Нередко *U.urealyticum* приводит к постродовому сепсису у женщин.

Для диагностики уреаплазмоза применяют как прямые методы выявления уреаплазм (полимеразная цепная реакция, реакция иммунофлуоресценции, выделение чистой культуры), так и серологические методы выявления специфических к *Ureaplasma urealyticum* антител. Определение антител в иммуноферментном анализе особенно актуально при хроническом уреаплазмозе, а также при восходящей уреаплазменной инфекции. ИФА - малоинвазивный метод исследования, который позволяет проводить комплексную диагностику урогенитальных заболеваний.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Выявление антител класса IgG, специфических к *Ureaplasma urealyticum*, в тест-системе Vitrotest® Ureaplasma-IgG базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы рекомбинантные антигены *U.urealyticum*. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета происходит связывание, при наличии в образцах, специфических к *U.urealyticum* антител с антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется конъюгат антивидовых анти-IgG моноклональных антител с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Комплексы антиген-антитело выявляют путем добавления раствора хромогена 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 15 min инкубации реакция останавливается добавлением стоп-реагента. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450 / 620-695 nm. Значение ОП, полученное для образца, позволяет выявить наличие или отсутствие антител класса IgG к *U.urealyticum*. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**4.1. Состав набора**

	1x96 лунок	ИФА-планшет В каждой лунке планшета засорбированы рекомбинантные антигены <i>Ureaplasma urealyticum</i> . Лунки можно отделять. 12 стрипов по 8 лунок.
	1x0,5 ml	Положительный контроль Раствор специфических моноклональных антител с консервантом (розовый).

CONTROL –	1x1,0 ml	Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x10 ml	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (коричнево-зеленый).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Раствор конъюгата Буферный раствор моноклональных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зеленый), готовый к использованию.
TMB SOLUTION	1x12 ml	Раствор ТМБ Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный), готовый к использованию.
WASH TWEEN 20X	1x50 ml	Раствор для промывания Tw20 (20X) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x12 ml	Стоп-реагент Раствор 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (бесцветный), готовый к использованию.

Клейкая пленка (2), бланк внесения проб (1), инструкция по применению и сертификат качества.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

- Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники к ним;
- спектрофотометр (ридер) для микропланшетов на 450/620-695 nm;
- мерная лабораторная посуда (10-1000 ml);
- деионизированная или дистиллированная вода;
- термостат на 37 °C;
- автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер);
- контейнеры для отходов потенциально зараженного материала;
- таймер;
- фильтровальная бумага;
- одноразовые перчатки;
- дезинфицирующие средства;
- защитная одежда.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Предостережения

Соблюдение времени инкубации и температуры является чрезвычайно важным для корректного результата ИФА.

- не использовать компоненты тест-системы после окончания срока годности;
- не использовать при анализе и не смешивать компоненты разных серий, компоненты с тест-систем различных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с наборами Vitrotest®;

*Примечание: допускается использование **WASH TWEEN|20X**, **TMB SOLUTION** и **STOP SOLUTION** других серий.*

- после использования реагента закрывать каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролировать наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз использовать новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегать попадания прямых солнечных лучей на реагенты тест-системы;
- **TMB SOLUTION** должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегать контакта **TMB SOLUTION** с металлами или ионами металлов. Для работы использовать только чистый, тщательно выполосканное дистиллированной водой посуду;
- ни в коем случае не использовать одну и ту же посуду для **CONJUGATE SOLUTION** и **TMB SOLUTION**.

Производитель не несет ответственности за любые некорректные результаты и неблагоприятные случаи, возникшие вследствие нарушений вышеуказанных предостережений. Производитель не несет ответственности за визуальный учет результатов анализа (без использования спектрофотометра).

5.2. Меры безопасности

- все реагенты набора предназначены только для *in vitro* диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в защитной одежде, одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный и отрицательный контроли тест-системы Vitrotest® Ureaplasma-IgG не содержат компонентов человеческого происхождения;
- некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании [TMB SOLUTION] [STOP SOLUTION] и [CONJUGATE SOLUTION] на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, необходимо обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В случае разбрызгивания кислоты, содержащуюся на поверхности кислоту сначала нужно нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность как описано выше.

5.3. Утилизация отходов

- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6 % в течение 3 h при комнатной температуре, или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5 % в течение 30 min, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121 °C в течение 1 h;
- не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- удаление инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством;
- удаление остальных компонентов тест-систем после использования проводить согласно GLP (good laboratory practice) и действующего национального законодательства в сфере обращения с отходами.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагенты тест-системы стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, если их хранить при температуре 2-8 °C. Не допускается замораживание тест-системы. Транспортировать набор при температуре 2-8 °C. Допускается однократная транспортировка при температуре не выше 23 °C в течение двух дней.

После вскрытия первичной упаковки компоненты тест-системы являются стабильными в течение 3 месяцев, кроме тех, которые указаны в п. 8 настоящей Инструкции.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцы сыворотки или плазмы крови (EDTA, литий-гепарин, цитрат натрия, фторид калия) хранить при температуре 2-8 °C не более 3 дней после забора. Для более длительного хранения образцы хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -70 °C. Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 min. Не использовать прогретые образцы. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освободить образец от нерастворимых включений центрифугированием при 3000 оборотов/min в течение 10-15 min. Не использовать образцы сывороток (или плазмы) с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным прорастанием. На результаты анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,21 mg/ml (361,8 µmol/l), гемоглобина в концентрации до 10 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Очень важно выдержать все реагенты тест-системы при комнатной температуре 18-25 °C в течение 30 min перед использованием!

8.1. Подготовка ИФА-планшета

[ELISA STRIPS] упакован под вакуумом с влагопоглотителем.

Для предупреждения конденсации воды в лунках следует открывать [ELISA STRIPS] только после выдержки 30 min при комнатной температуре. Затем раскрыть вакуумную упаковку, отделить необходимое количество лунок, а остальные сразу же тщательно упаковать с влагопоглотителем и **хранить плотно закрытыми на замок (zip-lock)** при температуре 2-8 °C. Хранение планшета таким способом обеспечивает его стабильность в течение 3 месяцев.

8.2. Приготовление раствора для промывания

Для приготовления раствора для промывания развести концентрат **WASH TWEEN 20X** 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, затем перемешать. Например, 4 ml концентрата + 76 ml воды, достаточно для 8 лунок. В случае наличия кристаллов в концентрате раствора для промывания прогреть флакон при температуре 37 °C до полного растворения кристаллов (15 - 20 min). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8 °C не более 7 дней.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
- 9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункту 8.2 данной Инструкции.
- 9.4. Внести во все лунки планшета по 80 µl **SAMPLE DILUENT**.
- 9.5. Внести в лунки по 20 µl контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – **CONTROL+**, в лунки B1, C1 и D1 – **CONTROL-**, в остальные лунки – исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования, происходит изменение цвета раствора в лунках с коричнево-зеленого на синий.
- 9.6. Заклеить стрипы клейкой плёнкой и инкубировать на протяжении 30 min при температуре 37 °C.
- 9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее по 300 µl раствором для промывания, оставить не менее чем на 30 s;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 µl;
 - повторить процедуру промывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишнего влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. В лунки внести по 100 µl **CONJUGATE SOLUTION**. Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 min при температуре 37 °C.
- 9.9. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в п. 9.7 данной инструкции.
- 9.10. Не дотрагиваясь до дна и стенок лунок планшета, внести по 100 µl **TMB SOLUTION** в лунки.
- 9.11. Инкубировать стрипы на протяжении 15 min в темном месте при комнатной температуре 18-25 °C. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
- 9.12. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 µl **STOP SOLUTION**, придерживаясь той же последовательности, что и при внесении **TMB SOLUTION**.
- 9.13. Измерять на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm на протяжении 5 min после остановки реакции. До проведения измерения следует убедиться в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

*Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае следует оставить лунку для установления бланка (в такую лунку внести только **TMB SOLUTION** и **STOP SOLUTION**).*

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Рассчитать среднее значение ОП отрицательного контроля (Nc), уровень граничного значения (Cut off - CO) и индекс позитивности образца (IP_{sample}):

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3;$$

$$CO = Nc + 0,25;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO,$$

где OD_{sample} – оптическая плотность образца

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

CONTROL +	ОП $\geq 1,2$
CONTROL -	ОП $\leq 0,15$

10.3. Интерпретация результатов

$IP_{\text{sample}} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ*
$IP_{\text{sample}} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

*Неопределенные образцы рекомендуется исследовать повторно. Если результаты снова будут в рамках «неопределенных», следует провести отбор нового образца.

Использование индекса позитивности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических антител в динамике в парных образцах, полученных от пациентов с интервалом в 2-4 недели.

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

Чувствительность и специфичность тест-системы Vitrotest® Ureaplasma-IgG оценивали с помощью коммерческой контрольной панели сывороток крови человека «Контроль AT-G(+/-)U.urealyticum-МБА» производства ООО «МедБиоАльянс» (Украина). В тест-системе Vitrotest® Ureaplasma-IgG все положительные и отрицательные образцы определялись корректно, соответственно чувствительность и специфичность составили 100 %.

Для оценки чувствительности тест-системы были проанализированы 32 образца сывороток крови, положительных в двух аналогичных коммерческих тест-системах. Относительная чувствительность тест-системы Vitrotest® Ureaplasma-IgG при этом составила 100,0 %.

В сравнительных исследованиях тест-системы Vitrotest® Ureaplasma-IgG с другой коммерческой тест-системой были проанализированы 84 образца сывороток крови людей. При этом относительная специфичность набора составила 98,8 %.

11.2. Точность

Повторяемость результатов в пределах одной постановки анализа (Intra assay repeatability)

Коэффициент вариации (CV) для двух образцов с различным уровнем специфических антител оценивали в 32 повторях на одной серии тест-системы.

N° образца	IP _{cp}	CV, %
33s	5,87	3,2
43s	11,00	4,5

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

Коэффициент вариации (CV) для двух образцов с различным уровнем специфических антител оценивали в течение четырех дней в четырех постановках анализа по 8 повторов в каждом анализе.

N° образца	IP _{cp}	CV, %
33s	5,74	4,3
43s	10,75	3,9

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Положительный результат в тест-системе Vitrotest® Ureaplasma-IgG свидетельствует о наличии у пациента антител класса IgG, специфических к *U.urealyticum*, продуцируемых организмом при инфицировании этим возбудителем.

Следует заметить, что в случае раннего уреоплазмоза результат ИФА может быть отрицательный из-за отсутствия антител на начальном этапе болезни. Поэтому отсутствие антител класса IgG, специфических к *U.urealyticum*, не исключает наличия уреоплазменной инфекции. Определение специфических к *U.urealyticum* антител в иммуноферментном анализе является особенно информативным при длительной и восходящей инфекции. Для постановки

диагноза следует учитывать как результаты комплексных лабораторных исследований (сериологические и прямые методы диагностики), так и клинические проявления заболевания.

13. ПРОБЛЕМЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА, И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

<i>Возможные причины</i>	<i>Способы устранения проблем</i>
<i>Высокий фон в лунках всего планшета</i>	
Загрязненный промыватель	Почистить головку промывателя и промыть 30 % раствором этилового спирта, затем дистиллированной водой
Низкое качество или загрязнения воды	Использовать очищенную воду с удельным сопротивлением ≥ 10 МΩ·см.
Использование плохо вымытой посуды	Использовать химически чистую посуду
Использование дезинфицирующих средств, содержащих хлор	Не использовать хлорсодержащие дезинфицирующие средства
Использование загрязненных наконечников	Использовать новые наконечники
Увеличено время инкубации или изменен температурный режим	Соблюдать режим инкубации в соответствии с инструкцией по применению
<i>Высокий фон в отдельных рядах</i>	
Повторное внесение раствора ТМБ	Раствор ТМБ вносить один раз
Загрязнение конуса автоматической пипетки раствором конъюгата	Прочистить пипетку и осторожно набирать жидкость
Загрязнен один из каналов промывателя	Почистить канал промывателя, промыть вошер
<i>Значения ОП положительного контроля ниже установленной границы</i>	
Неправильно внесен или отсутствует один из реагентов (конъюгат или раствор ТМБ)	Повторно провести ИФА, обратить внимание на правильность внесения этих реагентов
Сокращено время инкубации на одном из этапов	Проводить инкубацию в соответствии с инструкцией по применению
<i>Интенсивность окраски лунок не соответствует полученной оптической плотности</i>	
Смещен оптический луч	Проверить корректность работы ридера

ЛИТЕРАТУРА

1. Микоплазмы // Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Позеев – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – С. 517-528.
2. Тейлор-Робинсон Л., Рентон А. Какие тесты для диагностики инфекции, передаваемых половым путем, следует использовать в индустриально развитых странах // Заболевания, передаваемые по-ловым путем. – 1998. - №5. – С. 23-26.
3. Дяченко В.Ф., Бірюкова С.В., Старобінець З.Г. Лабораторна діагностика гнійно-запальних захворювань, обумовлених аспорогенними мікроорганізмами: Методичні рекомендації. – Харків, 2000. – 35 с.
4. Уніфікація лабораторних методів дослідження в діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом / Укладачі І.І.Мавров, О.П.Белозеров, Л.С. Тацька. – Харків: Факт, 2000. – 120 с.

ГРАФИЧЕСКИЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Номер по каталогу
	Используйте инструкцию по применению
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Производитель
	Предупреждение
	Достаточно для проведения <n> количества исследований
	Ограничение температуры
	Код партии
	Использовать до
	Дата производства
	Беречь от прямых солнечных лучей
	Знак соответствия техническим регламентам

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_Ureaplasma-IgG_TK028_V06_RU
Редакция Инструкции № 6 от 15.12.2022 г.

По вопросам и пожеланиями относительно работы изделия обращайтесь к производителю:



ООО «Витротест Биореагент»,
ул. М. Бойчука 18 б, оф. 56, г. Киев, 01103, Украина (юридический адрес)
ул. Курортная, дом. 11, г. Киев, 04075, Украина (местонахождение производства)

тел.: +38 (044) 222-76-72, +38 (097) 222-76-72
e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



Vitrotest® Ureaplasma-IgG

СХЕМА АНАЛИЗА



Выдержать все реагенты и образцы минимум 30 min при 18-25 °С перед использованием



Внести 80 µl [SAMPLE DILUENT] в лунки стрипов (коричнево-зеленый)



Внести 20 µl контролей и образцов в лунки:

A1 – [CONTROL +],

B1, C1, D1 – [CONTROL -],

E1 и в другие лунки – исследуемые образцы

(цвет изменится с коричнево-зеленого на синий)



Накрыть стрипы клейкой пленкой и инкубировать 30 min при 37 °С



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 по 300 µl в лунку с 30 s замачиванием



Добавить 100µl [CONJUGATE SOLUTION] в каждую лунку (зеленый цвет)



Заклеить стрипы новой клейкой пленкой и инкубировать 30 min при 37 °С



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 по 300 µl в лунку с 30 s замачиванием



Внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в каждую лунку без клейкой пленки



Инкубировать стрипы 15 min в темноте при 18-25 °С



Остановить реакцию добавлением 100 µl [STOP SOLUTION] (цвет меняется с синего на желтый)



Определить оптическую плотность (OD) при 450/620-695 nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3; \quad CO = Nc + 0,25;$$
$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO;$$

Nc - среднее значение ОП 3 [CONTROL -],

CO - граничное значение, IP- индекс позитивности

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$IP_{sample} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ
$IP_{sample} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

Vitrotest® Ureaplasma-IgM

Иммуноферментная тест-система для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM к *Ureaplasma urealyticum*

**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Иммуноферментная тест-система Vitrotest® Ureaplasma-IgM предназначена для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM к *Ureaplasma urealyticum* в сыворотке или плазме крови человека.

Тест-набор может быть применен как для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием автоматических пипеток и стандартного оборудования, так и для постановки на автоматическом иммуноферментном анализаторе открытого типа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Микроорганизм *Ureaplasma urealyticum* вызывает воспалительные заболевания органов мочеполовой системы человека. Уреаплазмы часто обнаруживают у женщин, больных вагинитом, циститом. Проникновение возбудителя в верхние отделы половой системы может привести к нарушению репродуктивных функций. У мужчин *U.urealyticum* является причиной негонекоккового уретрита и простатита (до 50 % случаев). Доказана роль уреаплазм в развитии большинства случаев мочекаменной болезни. Нередко *U.urealyticum* приводит к постродовому сепсису у женщин.

Для диагностики уреаплазмоза применяют как прямые методы выявления уреаплазм (полимеразная цепная реакция, реакция иммунофлуоресценции, выделение чистой культуры), так и серологические методы выявления специфических к *Ureaplasma urealyticum* антител. Определение антител в иммуноферментном анализе особенно актуально при хроническом уреаплазмозе, а также при восходящей уреаплазменной инфекции. ИФА - малоинвазивный метод исследования, который позволяет проводить комплексную диагностику урогенитальных заболеваний.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Определение антител класса IgM, специфических к *Ureaplasma urealyticum*, в тест-системе Vitrotest® Ureaplasma-IgM базируется на принципе «IgM-захвата» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы моноклональные антитела, специфичные к иммуноглобулинам класса М человека. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета иммуноглобулины класса М связываются с моноклональными антителами на твердой фазе. После отмывания несвязанных компонентов в лунку добавляется конъюгат рекомбинантного антигена *U.urealyticum* с пероксидазой хрена, который связывается со специфическими IgM в составе образованных иммунных комплексов на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Иммунные комплексы выявляются добавлением раствора хромогена 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30 min инкубации реакция останавливается и оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**4.1. Состав набора**

	1x96 лунок	ИФА-планшет В каждой лунке планшета засорбированы моноклональные антитела, специфичные к иммуноглобулинам класса М человека. Лунки можно отделять. 12 стрипов по 8 лунок.
	1x0,5 ml	Положительный контроль Раствор иммуноглобулинов с консервантом (розовый).

CONTROL -	1x0,5 ml	Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (фиолетовый).
CONJUGATE DILUENT	1x13 ml	Раствор для розведения конъюгата Буферный раствор с детергентом и консервантом (желтый).
CONJUGATE 11X	1x1,3 ml	Конъюгат (11x) 11-ти кратный концентрат конъюгата рекомбинантного <i>U.urealyticum</i> с пероксидазой хрена в буферном растворе со стабилизаторами (синий).
TMB SOLUTION	1x12 ml	Раствор ТМБ Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный), готовый к использованию.
WASH TWEEN 20X	1x50 ml	Раствор для промывания Tw20 (20x) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x12 ml	Стоп-реагент Раствор 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (бесцветный), готовый к использованию.

Клейкая пленка (2), бланк внесения проб (1), инструкция по применению и сертификат качества.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

- Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники к ним;
- спектрофотометр (ридер) для микропланшетов на 450/620-695 nm;
- мерная лабораторная посуда (10-1000 ml);
- деионизированная или дистиллированная вода;
- термостат на 37 °C;
- автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер);
- контейнеры для отходов потенциально зараженного материала;
- таймер;
- фильтровальная бумага;
- одноразовые перчатки;
- дезинфицирующие средства;
- защитная одежда.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Предостережения

Соблюдение времени инкубации и температуры является чрезвычайно важным для корректного результата ИФА.

- не использовать компоненты тест-системы после окончания срока годности;
- не использовать при анализе и не смешивать компоненты разных серий, компоненты с тест-систем различных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с наборами Vitrotest®;

*Примечание: допускается использование **WASH TWEEN 20X**, **TMB SOLUTION** и **STOP SOLUTION** других серий.*

- после использования реагента закрывать каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролировать наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз использовать новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- **избегать попадания** прямых солнечных лучей на реагенты тест-системы;
- **TMB SOLUTION** должен быть бесцветным перед использованием. Если **раствор окрашен** в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегать контакта **TMB SOLUTION**

с металлами или ионами металлов. Для работы использовать только чистый, тщательно выполосканное дистиллированной водой посуду;

- ни в коем случае не использовать одну и ту же посуду для раствора конъюгата и **TMB SOLUTION**;

Производитель не несет ответственности за любые некорректные результаты и неблагоприятные случаи, возникшие вследствие нарушений вышеуказанных предостережений. Производитель не несет ответственности за визуальный учет результатов анализа (без использования спектрофотометра).

5.2. Меры безопасности

- все реагенты набора предназначены только для *in vitro* диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в защитной одежде, одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный и отрицательный контроли тест-системы Vitrotest® Ureaplasma-IgM не содержат компонентов человеческого происхождения;
- некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации **вредных веществ** и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании **TMB SOLUTION** **STOP SOLUTION** и раствора конъюгата на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, необходимо обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В случае разбрызгивания кислоты, содержащую на поверхности кислоту сначала нужно нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность как описано выше.

5.3. Утилизация отходов

- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6 % в течение 3 h при комнатной температуре, или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5 % в течение 30 min, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121 °C в течение 1 h;
- не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- удаление инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством;
- удаление остальных компонентов тест-систем после использования проводить согласно GLP (good laboratory practice) и действующего национального законодательства в сфере обращения с отходами.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагенты тест-системы стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, если их хранить при температуре 2-8 °C. Не допускается замораживание тест-системы. Транспортировать набор при температуре 2-8 °C. Допускается однократная транспортировка при температуре не выше 23 °C в течение двух дней.

После вскрытия первичной упаковки компоненты тест-системы являются стабильными в течение 3 месяцев, кроме тех, которые указаны в п. 8 настоящей Инструкции.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцы сыворотки или плазмы крови (EDTA, литий-гепарин, цитрат натрия) хранить при температуре 2-8 °C не более 3 дней после забора. Для более длительного хранения образцы хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -70 °C. Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 min. Не использовать прогретые образцы. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освободить образец от нерастворимых включений центрифугированием при 3000 оборотов/min в течение 10-15 min. Не использовать образцы сывороток (или плазмы) с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным прорастанием. На результаты анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,21 mg/ml (361,8 µmol/l), гемоглобина в концентрации до 10 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Очень важно выдержать все реагенты тест-системы при комнатной температуре 18-25 °C в течение 30 мин перед использованием!

8.1. Подготовка ИФА-планшета

[ELISA STRIPS] упакован под вакуумом с влагопоглотителем.

Для предупреждения конденсации воды в лунках следует открывать [ELISA STRIPS] только после выдержки 30 мин при комнатной температуре. Затем раскрыть вакуумную упаковку, отделить необходимое количество лунок, а остальные сразу же тщательно упаковать с влагопоглотителем и **хранить плотно закрытыми на замок (zip-lock)** при температуре 2-8 °C. Хранение планшета таким способом обеспечивает его стабильность в течение 3 месяцев.

8.2. Приготовление раствора для промывания

Для приготовления раствора для промывания развести концентрат [WASH TWEEN] 20X 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, затем перемешать. Например, 4 ml концентрата + 76 ml воды, достаточно для 8 лунок. В случае наличия кристаллов в концентрате раствора для промывания прогреть флакон при температуре 37 °C до полного растворения кристаллов (15 - 20 min). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8 °C не более 7 дней.

8.3. Приготовление раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата готовится следующим образом:

Развести [CONJUGATE] 11X (синий) в чистом флаконе [CONJUGATE DILUENT] (желтый) в соотношении 1:11 (то есть, 1 + 10), раствор окрашивается в зеленый цвет. Например, для 8 лунок анализа добавить в 1 ml [CONJUGATE DILUENT] 100 µl [CONJUGATE] 11X.

Раствор конъюгата в рабочем разведении стабилен в течение суток при условии хранения при 2-8 °C.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

9.1. Подготовить необходимое количество лунок для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.

9.2. Заполнить бланк внесения проб.

9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункту 8.2 данной Инструкции.

9.4. Внести во все лунки планшета по 90 µl [SAMPLE DILUENT].

9.5. Внести в лунки по 10 µl контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – [CONTROL] +, в лунки B1, C1 и D1 – [CONTROL] -, в остальные лунки – исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования, происходит изменение цвета раствора в лунках с фиолетового на синий.

Отбор, внесение и пипетирование [CONTROL] + проводить с особой тщательностью.

9.6. Заклеить стрипы клейкой плёнкой и инкубировать на протяжении 30 min при температуре 37 °C.

9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:

- удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
- наполнить лунки не менее по 300 µl раствором для промывания, оставить не менее чем на 30 s;
- аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 µl;
- повторить процедуру промывания еще четыре раза;
- после последней аспирации избавиться от лишнего влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

9.8. Приготовить раствор конъюгата согласно пункта 8.3.

9.9. В лунки внести по 100 µl раствора конъюгата (в рабочем разведении 1:11). Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 min при 37 °C.

9.10. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в п. 9.7 данной инструкции.

9.11. Не затрагиваясь до дна и стенок лунок планшета, внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в лунки.

9.12. Инкубировать стрипы на протяжении 30 min в темном месте при комнатной температуре 18-25 °C. Не использовать клейкую пленку на данному этапе.

9.13. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 µl [STOP SOLUTION], придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [TMB SOLUTION].

9.14. Измерять на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm на протяжении 5 min после остановки реакции. До проведения измерения следует убедиться в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 нм, в этом случае следует оставить лунку для установления бланка (в такую лунку внести только [TMB SOLUTION] и [STOP SOLUTION]).

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Рассчитать среднее значение ОП отрицательного контроля (Nc), уровень граничного значения (Cut off - CO) и индекс позитивности образца (IP_{sample}):

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3;$$

$$CO = Nc + 0,25;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO,$$

где OD_{sample} – оптическая плотность образца

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

[CONTROL] +	ОГ ≥ 1,2
[CONTROL] -	ОГ ≤ 0,15

10.3. Интерпретация результатов

IP _{sample} > 1,1	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
0,9 ≤ IP _{sample} ≤ 1,1	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ*
IP _{sample} < 0,9	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

*Неопределенные образцы рекомендуется исследовать повторно. Если результаты снова будут в рамках «неопределенных», следует провести отбор нового образца.

Использование индекса позитивности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических антител в динамике в парных образцах, полученных от пациентов с интервалом в 2-4 недели.

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Точность

Повторяемость результатов в пределах одной постановки анализа (Intra assay repeatability)

Коэффициент вариации (CV) для двух образцов с различным уровнем специфических антител оценивали в 32 повторях на одной серии тест-системы.

№ образца	ОП _{сеп}	IP _{сеп}	CV, %
1К	1,726	5,93	4,9
2К	0,903	3,10	7,1

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

Коэффициент вариации (CV) для двух образцов с различным уровнем специфических антител оценивали в течение четырех дней в четырех постановках анализа по 8 повторов в каждом анализе.

№ образца	ОП _{сеп}	IP _{сеп}	CV, %
1К	1,799	6,16	5,5
2К	0,893	3,06	6,2

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Положительный результат в тест-системе Vitrotest® Ureaplasma-IgM является свидетельством наличия у пациента антител класса IgM, специфических к *U.urealyticum*, которые продуцируются организмом при инфицировании этим возбудителем.

Следует заметить, что в случае раннего уреоплазмоза результат ИФА может быть отрицательным из-за отсутствия антител на начальном этапе заболевания. Поэтому отсутствие антител класса IgM, специфических к *U.urealyticum*, не исключает наличия уреоплазменной инфекции. Для постановки диагноза следует учитывать как результаты комплексных лабораторных исследований (серологические и прямые методы диагностики), так и клинические проявления заболевания.

13. ПРОБЛЕМЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА, И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

<i>Возможные причины</i>	<i>Способы устранения проблем</i>
<i>Высокий фон в лунках всего планшета</i>	
Загрязненный промыватель	Почистить головку промывателя и промыть 30 % раствором этилового спирта, затем дистиллированной водой
Низкое качество или загрязнения воды	Использовать очищенную воду с удельным сопротивлением $\geq 10 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$.
Использование плохо вымытой посуды	Использовать химически чистую посуду
Использование дезинфицирующих средств, содержащих хлор	Не использовать хлорсодержащие дезинфицирующие средства
Использование загрязненных наконечников	Использовать новые наконечники
Увеличено время инкубации или изменен температурный режим	Соблюдать режим инкубации в соответствии с инструкцией по применению
<i>Высокий фон в отдельных рядах</i>	
Повторное внесение раствора ТМБ	Раствор ТМБ вносить один раз
Загрязнение конуса автоматической пипетки раствором конъюгата	Прочистить пипетку и осторожно набирать жидкость
Загрязнен один из каналов промывателя	Почистить канал промывателя, промыть вошер
<i>Значения ОП положительного контроля ниже установленной границы</i>	
Неправильно внесен или отсутствует один из реагентов (конъюгат или раствор ТМБ)	Повторно провести ИФА, обратить внимание на правильность внесения этих реагентов
Сокращено время инкубации на одном из этапов	Проводить инкубацию в соответствии с инструкцией по применению
<i>Интенсивность окраски лунок не соответствует полученной оптической плотности</i>	
Смещен оптический луч	Проверить корректность работы ридера

ЛИТЕРАТУРА

1. Микоплазмы // Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Позеев – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – С. 517-528.
2. Тейлор-Робинсон Л., Рентон А. Какие тесты для диагностики инфекции, передаваемых половым путем, следует использовать в индустриально развитых странах // Заболевания, передаваемые по-ловым путем. – 1998. - №5. – С. 23-26.
3. Дяченко В.Ф., Бірюкова С.В., Старобінець З.Г. Лабораторна діагностика гнійно-запальних захворювань, обумовлених аспорогенними мікроорганізмами: Методичні рекомендації. – Харків, 2000. – 35 с.
4. Уніфікація лабораторних методів дослідження в діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом / Укладачі І.І.Мавров, О.П.Белозеров, Л.С. Тацька. – Харків: Факт, 2000. – 120 с.

ГРАФИЧЕСКИЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Номер по каталогу
	Используйте инструкцию по применению
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Производитель
	Предупреждение
	Достаточно для проведения <л> количества исследований
	Ограничение температуры
	Код партии
	Использовать до
	Дата производства
	Беречь от прямых солнечных лучей
	Знак соответствия техническим регламентам

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_Ureaplasma-IgM_TK096_V02_RU
Редакция Инструкции № 2 от 17.01.2023 г.

По вопросам и пожеланиями относительно работы изделия обращайтесь к производителю:



ООО «Витротест Биореагент»,
ул. М. Бойчука 18 б, оф. 56, г. Киев, 01103, Украина (юридический адрес)
ул. Курортная, дом. 11, г. Киев, 04075, Украина (местонахождение производства)

тел.: +38 (044) 222-76-72, +38 (097) 222-76-72
e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



Vitrotest® Ureaplasma-IgM

СХЕМА АНАЛИЗА



Выдержать все реагенты и образцы не менее 30 min при 18-25 °С перед использованием



Внести по 90 µl **[SAMPLE DILUENT]** в лунки стрипов (фиолетовый цвет)



Внести по 10 µl контролей и образцов в лунки:

A1 – **[CONTROL +]**,

B1, C1, D1 – **[CONTROL -]**,

E1 и остальные лунки – исследуемые образцы (цвет меняется с фиолетового на синий)



Заклеить стрипы клейкой пленкой, инкубировать 30 min при 37 °С



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 по 300 µl в лунку с 30 s замачиванием



Внести по 100 µl раствора конъюгата (в рабочем разведении 1:1) в каждую лунку (зелёный цвет)



Заклеить стрипы новой клейкой пленкой, инкубировать 30 min при 37 °С



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 по 300 µl в лунку с 30 s замачиванием



Внести по 100 µl **[TMB SOLUTION]** в каждую лунку



Инкубировать 30 min в тёмном месте при 18-25 °С без клейкой пленки



Остановить реакцию внесением по 100 µl **[STOP SOLUTION]** (цвет меняется с синего на жёлтый)



Определить оптическую плотность (OD) при 450/620-695 nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3; \quad CO = Nc + 0,25;$$
$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO;$$

Nc - среднее значение ОП 3 **[CONTROL -]**,

CO - граничное значение, IP- индекс позитивности

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$IP_{sample} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ
$IP_{sample} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ