

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	2
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	3
5. СОСТАВ НАБОРА	4
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	4
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	5
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	6
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	7
11. ЛИТЕРАТУРА	11

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG АНТИТЕЛ К
АНТИГЕНАМ UREAPLASMA SPP. В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ
«Ureaplasma IgG-ИФА»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Ureaplasma IgG-ИФА» предназначен для качественного определения концентрации IgG антител к антигенам Ureaplasma spp. в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

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

Для диагностики уреаплазмоза используют как прямые методы определения уреаплазм (полимеразная цепная реакция, реакция иммунофлуоресценции, выделение чистой культуры), так и серологические методы определения специфических к Ureaplasma urealyticum антител. Определение антител в иммуноферментном анализе (ИФА) является особо актуальным при хроническом уреаплазмозе, а также, при восходящей уреаплазменной инфекции. ИФА – малоинвазивный метод исследования, который позволяет осуществлять комплексную диагностику урогенитальных заболеваний.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgG антител к антигенам Ureaplasma spp. основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы антигены U.urealyticum. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию IgG антител к антигенам Ureaplasma spp. в исследуемом образце. Индекс позитивности (ИП, %) IgG антител к антигенам Ureaplasma spp. в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность и чувствительность. Чувствительность Набора реагентов «Ureaplasma IgG-ИФА» оценивали с помощью панели охарактеризованных сывороток, которая состоит из 42 образцов сывороток крови человека, содержащих IgG антитела к U.urealyticum. В Наборе реагентов «Ureaplasma IgG-ИФА» все сыворотки были определены как положительные. При исследовании 127 отрицательных на антитела к IgG антитела к U.urealyticum сывороток показатель специфичности составил более 98 %.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG антител к антигенам U.urealyticum в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «Ureaplasma IgG-ИФА» не превышает 8,0 %.

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на двух сериях Набора реагентов «Ureaplasma IgG-ИФА» (Intra-assay):

образец, №	кол-во повторов	значение, ИП средний	CV1, %	CV2, %
1	32	5,1	6,8	7,1
2	32	2,3	5,2	5,6

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на одной серии Набора реагентов «Ureaplasma IgG-ИФА» в течение трех дней (Inter-assay):

образец, №	кол-во повторов	значение, ИП средний	CV1, %
1	8	6,3	7,3
2	8	3,1	6,2

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0 % раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Требования безопасности Medical Laboratories, REQUIEREMENTS FOR SAFETY Гост Р52905-2007 (ИСО 15190:2003).

4.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P126Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт	-
2	CN126Z CP126Z	CONTROL- CONTROL+	Контрольные сыворотки (отрицательный и положительный контроли) на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgG антител к антигенам <i>Ureaplasma spp.</i> ; готовы к использованию (0,5 мл и 0,2 мл соответственно)	2	шт	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
3	T126Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная жидкость зеленого цвета
4	SP126Z	DIL	Буфер для разведения образцов ; готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная жидкость красного цвета
5	R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) ; готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21х-кратный (22 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	STOP	Стоп-реагент ; готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт	-
9	K126I	-	Инструкция по применению Набора реагентов « <i>Ureaplasma</i> IgG-ИФА»	1	шт	-
10	K126Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов « <i>Ureaplasma</i> IgG-ИФА»	1	шт	-

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ,
НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 10–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки одноразовые резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с Планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы тщательно заклеить Бумагой для заклеивания планшета, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество Концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл Концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «Ureaplasma IgG-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого Набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 46 исследуемых образцов и 2 проб контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить Бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- Буфер для разведения образцов, Конъюгат, Раствор субстрата ТМБ, Стоп-реагент – после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- Контрольные сыворотки после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным Концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия.

Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов - исследуемые образцы в 2 повторах и 4 лунки для Контрольных сывороток (Отрицательный контроль 3 лунки, Положительный контроль 1 лунка).
2	Внесите во все лунки планшета по 80 мкл Буфера для разведения образцов.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 20 мкл Контрольных сывороток. В остальные лунки внесите в дубликатах по 20 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, Контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
4	ВНИМАНИЕ! При внесении образцов сыворотки (плазмы) крови происходит изменение цвета раствора.
5	Аккуратно перемешайте содержимое Планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет Бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните Планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл Конъюгата.
8	Заклейте Планшет Бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
10	Внесите во все лунки по 100 мкл Раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение Раствора субстрата ТМБ в лунки необходимо произвести в течение 2–3 минут. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и Раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл Стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок Планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок Планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения Стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.
13	Рассчитайте содержание антител к антигенам лямблий в исследуемых образцах. Для этого: 1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля: $ОП (CN126Z)Cp = (ОП1 (CN126Z) + ОП2 (CN126Z) + ОП3 (CN126Z)) / 3;$ Результаты анализа считать достоверными, если: - ОП Положительного контроля не ниже 1.2 оптических единиц (ОЕ); - ОП Отрицательного контроля не выше 0.15 ОЕ во всех лунках; - ОП каждого значения Отрицательного контроля отличается не более чем в два раза от среднего значения Отрицательного контроля, т.е. $ОП (CN126Z)Cp \times 0.5 < ОПn (CN126Z) < ОП (CN126Z)Cp \times 2.0$; - если одно из значений Отрицательного контроля выходит за пределы этого интервала, то его значение не участвует в расчете ОП (CN101MZ)Cp. 2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.25 $Cut\ off = ОП (CN126Z)Cp + 0.25$ 3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off $ИП = ОП_{образца} / Cut\ off$

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определять параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

10.2. Интерпретация результатов:

- при $ИП > 1,1$ образец положительный;

- при $ИП < 0,9$ образец отрицательный;

- при значении ИП, лежащем в промежутке от 0,91 до 1,09 – результат в пограничной зоне (+/-). Такие сыворотки рекомендуется исследовать повторно. Если повторный полученный результат будет неопределенным, то следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными.

Положительный результат свидетельствует о наличии у пациента антител класса IgG, специфических к *U.urealyticum*, которые продуцируются организмом при инфицировании этим возбудителем.

Стоит заметить, что в случае раннего уреоплазмоза результат ИФА может быть отрицательным из-за отсутствия антител на начальном этапе заболевания. Поэтому отсутствие антител класса IgG, специфических к *U.urealyticum*, не исключает наличия уреоплазменной инфекции.

Определение специфических к *U.urealyticum* антител в иммуноферментном анализе является особо информативным при продолжительной и восходящей инфекции.

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

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Микоплазмы // Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Позеев – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – С. 517-528.

3. Раковская И.В. Микоплазмы и микоплазмозы человека: Руководство для врачей. – М., 1999. – 38 с.

4. Waites K.B. et al. Chronic *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections of central nervous system in preterm infants // *Lancet*. – 1988. – 2/9. – P. 17-21.

5. Cassell G.H. et al. *Ureaplasma urealyticum* intra-uterine infection role in prematurely and disease in newborns // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1993. – 6(1). – P. 69-87.

По вопросам, касающимся качества Набора **«Ureaplasma IgG-ИФА»**,
следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:

105043, Москва, а/я 58,

тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqs@xema.ru

интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,

к. б. н. Д. С. Кострикин