

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
"ИФА-Мико-гоминис-IgA/IgM/IgG"
Тест-система иммуноферментная для выявления
антител классов А, М и G к *Mycoplasma hominis*

Комплект № 2 "ИФА-мико-гоминис- IgM "
Тест-система иммуноферментная для выявления
иммуноглобулинов класса М к *Mycoplasma hominis*

Регистрационное удостоверение №ФСР 2012/13564 от 10 мая 2018 г

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление видоспецифических иммуноглобулинов класса М к *Mycoplasma hominis* в сыворотке (плазме) крови человека методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	рекомбинантный антиген <i>Mycoplasma hominis</i> , сорбированный в лунках 96-луночного разборного полистиролового планшета для иммунологических реакций с плоским дном	1 планшет
	<i>допускается раздельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)</i>	
Контрольный положительный образец (К ⁺)	инактивированный; прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета	1 фл. (1,5 мл)
Контрольный отрицательный образец (К ⁻)	инактивированный; прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость желтого цвета	1 фл. (2,5 мл)
Конъюгат	антитела моноклональные мышинные против иммуноглобулинов человека класса М, конъюгированные с пероксидазой хрена; прозрачная или опалесцирующая жидкость синего цвета	1 фл. (12 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(х25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	1 фл. (40 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	прозрачная или опалесцирующая жидкость фиолетового цвета	1 фл. (12 мл)
Раствор индикаторный (РИ);	прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость	1 фл. (12 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (12,5 мл)

Примечания. 1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(х25), РИ, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты.

Набор может быть дополнительно укомплектован:

вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),

одноразовыми наконечниками для автоматических пипеток на 4-200 мкл (16 шт).

липкой пленкой для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации набора позволяет исследование 96 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 2 или 4 лунки). Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Лунок для контроля	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Число иссл. образцов	1-6	7-12	13-20	21-28	29-36	37-44	45-52	53-60	61-68	69-76	77-84	85-92

ПРИНЦИП МЕТОДА

При наличии в исследуемом образце иммуноглобулинов класса М к *Mycoplasma hominis* они во время первой инкубации связываются с антигеном *Mycoplasma hominis*, сорбированным на поверхности лунок полистиролового планшета. Этот комплекс во время второй инкубации связывается с конъюгатом – антителами против IgM человека, мечеными пероксидазой хрена. Далее, после добавления индикаторного раствора (хромоген - тетраметилбензидин) в результате ферментативной реакции реакционная смесь в лунках планшета окрашивается пропорционально концентрации антител к *Mycoplasma hominis*. Реакция останавливается добавлением стоп-реагента. Интенсивность окрашивания (оптическая плотность) регистрируется с помощью спектрофотометра.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Диагностическая чувствительность набора при определении на сыворотках стандартной панели предприятия, содержащих антитела класса М к *Mycoplasma hominis* – 100 %.

Диагностическая специфичность набора при определении на сыворотках стандартной панели предприятия, не содержащих антитела к *Mycoplasma hominis* – 100 %.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка (плазма) крови человека объемом не менее 20 мкл.

Образцы до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С или до 3 мес при температуре минус 20 °С или более низкой. Допускается только однократное замораживание-размораживание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы (для "ручной" постановки)

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

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

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин, термостат на 37 °С, холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

При использовании всего планшета содержимое флакона с ФСБ-Т(х25) довести водой очищенной до 1 л.

При дробной постановке использовать соотношения объемов ФСБ-Т(х25) и воды, указанные в табл. 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1

Число стрипов	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ФСБ-Т(х25), мл	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37
Вода очищенная, мл	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, K^- , K^+ , РРО, конъюгат, РИ, стоп-реагент – готовы к применению. После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Проведение ИФА ("ручная" постановка)

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из упаковки рамку планшета и необходимое число стрипов. Неиспользованные стрипы допускается хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Стрипы промыть 1 раз ФСБ-Т, внося в лунки 350-370 мкл раствора. При наличии промывателя, позволяющего производить промывку в режиме "Overflow", использовать именно этот режим. По окончании промывки остатки раствора удалить из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

2. При использовании 1 стрипа в одну лунку внести 100 мкл K^+ , в следующую лунку – 100 мкл K^- , в остальные лунки – по 100 мкл РРО.

При использовании двух и более стрипов в две лунки внести по 100 мкл K^+ , и в две лунки по 100 мкл K^- , в остальные лунки – по 100 мкл РРО.

В лунки с РРО внести исследуемые образцы (по лунке на образец) – по 10 мкл. Раствор перемешать 5 раз пипетированием, при этом цвет РРО должен измениться.

3. Планшет заклеить липкой пленкой. Инкубировать 30 мин при температуре 37°С.

4. С помощью промывателя удалить жидкость из лунок, 5 раз промыть планшет ФСБ-Т, как указано в п. 1.

5. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата.

6. Планшет заклеить липкой пленкой. Инкубировать 30 мин при температуре 37 °С.

7. С помощью промывателя удалить жидкость из лунок, 5 раз промыть планшет ФСБ-Т, как указано в п. 1.

8. Во все лунки внести по 100 мкл РИ, планшет заклеить липкой пленкой, поместить в защищенное от света место и инкубировать 15 мин при температуре 37°С.

9. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился РИ) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и не более чем через 10 мин приступить к учету результатов.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм (допустимо использование фильтра сравнения с длиной волны 620-650 нм). Нулевой уровень («бланк») установить по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при следующих условиях:

значение ОП K^+ не менее 0,5;

среднее значение ОП K^- не более 0,2.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Рассчитать критическое значение оптической плотности $ОП_{крит}$ по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{к-ср.} + 0,25.$$

Интерпретация результатов

Соотношение $ОП_{обр}$ и $ОП_{крит}$	Интерпретация результатов
$ОП_{обр} < 0,9 \times (ОП_{крит})$	Отрицательный результат. Указывает, что исследуемый образец либо не содержит антител класса М к <i>Mycoplasma hominis</i> , либо уровень антител не детектируется
$0,9 \times (ОП_{крит}) < ОП_{обр} < 1,2 \times (ОП_{крит})$	Сомнительный результат («серая зона»). Повторить анализ. Если повторное исследование выявило, что $ОП_{обр}$ меньше $ОП_{крит}$. – результат считать отрицательным. При увеличении концентрации IgM-антител или выявлении IgG-антител результат считать положительным
$ОП_{обр} > 1,2 \times (ОП_{крит.})$	Положительный результат. Указывает, что исследуемый образец содержит антитела класса М к <i>Mycoplasma hominis</i>

Повторно взятые образы сыворотки крови желательно анализировать одновременно с предыдущими («парные» сыворотки), что позволяет с большей достоверностью оценивать динамику специфических антител.

При исследовании парных сывороток достоверными критериями для серологического диагноза формы инфекции (острая, хроническая, перенесенная) и успешности терапии являются:

двукратное повышение/понижение титра видоспецифических IgA;

двукратное повышение/понижение титра видоспецифических IgA в комбинации с двух-трехкратным повышением/понижением титров IgG;

сероконверсия одного из классов антител.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение - в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Транспортирование - при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1. ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК и в учреждение, уполномоченное Росздравнадзором на проведение Государственного контроля указанной продукции.

КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА "ИФА-Мико-гоминис-IgM"

<u>Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!</u>	
Промыть	1 раз ФСБ-Т
Внести	в одну (или две лунки) - 100 мкл K ⁺ , в одну (или две лунки) - 100 мкл K ⁻ , в остальные – по 100 мкл РРО и по 10 мкл исследуемых образцов (по 1 лунке на образец)
Инкубация	30 мин, 37 °С
Промыть	5 раз ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 100 мкл конъюгата
Инкубация	30 мин, 37 °С
Промыть	5 раз ФСБ-Т
Внести	по 100 мкл раствора индикаторного в каждую лунку
Инкубация	15 мин, 37 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» – по воздуху

Май 2018 г.