«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«05» _____ 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к *Mycoplasma hominis*

«Mycoplasma hominis – IgG – ИФА – БЕСТ»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G (IgG) к антигену p120 *Mycoplasma hominis* в сыворотке (плазме) крови человека и может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях.

1.2. Набор реагентов рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок ИФА, при каждой из которых 3 лунки используют для постановки контролей.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантного антигена. Во время первой инкубации, при наличии в исследуемых образцах иммуноглобулинов класса G к *Mycoplasma hominis*, происходит их связывание с иммобилизованным на поверхности лунок планшета рекомбинантным антигеном p120 *Mycoplasma hominis*. Не связавшийся материал удаляют отмывкой.

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

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

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм. Интенсивность жёлтого окрашивания

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце иммуноглобулинов класса G к *Mycoplasma hominis.*

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

2.2. Состав набора

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

– планшет разборный с иммобилизованным рекомбинантным антигеном p120 *Mycoplasma hominis* – 1 шт.;

– положительный контрольный образец ($К^+$), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий иммуноглобулины класса G к *Mycoplasma hominis* – прозрачная жидкость красного цвета – 1 флакон (0,5 мл);

– отрицательный контрольный образец ($К^-$), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий иммуноглобулины класса G к *Mycoplasma hominis* – прозрачная жидкость желтого цвета – 1 флакон (1,0 мл);

– конъюгат – антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена, лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета – 1 флакон или 2 флакона;

– раствор для предварительного разведения (РПР) – прозрачная бесцветная жидкость— 1 флакон (3,0 мл);

– раствор для разведения конъюгата (РК) – прозрачная жидкость зеленого цвета — 1 флакон (13,0 мл);

– разводящий буфер для сывороток (РБС) – прозрачная жидкость красного цвета – 1 флакон (13,0 мл);

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при нагревании — 1 флакон (28,0 мл);

– раствор ТМБ – прозрачная бесцветная или с желтоватым оттенком жидкость — 1 флакон (13,0 мл);

– стоп-реагент – раствор серной кислоты, 0,5 моль/л – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

– пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– ванночками для реагентов – 2 шт.;

– наконечниками для пипетки на 4-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса G к *Mycoplasma hominis* должен соответствовать требованиям СПП (рег. № 05-2-176 от 12.01.09), включающей образцы сывороток, содержащие специфические IgG к *Mycoplasma hominis*: чувствительность по иммуноглобулинам класса G к *Mycoplasma hominis* – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса G к *Mycoplasma hominis* должен соответствовать требованиям СПП (рег. № 05-2-176 от 12.01.09), включающей образцы сывороток, не содержащие IgG к *Mycoplasma hominis*: специфичность по иммуноглобулинам класса G к *Mycoplasma hominis* – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При подготовке к проведению анализа следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

– работать в резиновых перчатках;

– не пипетировать растворы ртом;

– все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

– Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 650 нм;

– термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 до 300 мкл;

– промывочное устройство для планшета;

– перчатки резиновые хирургические;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– бумага фильтровальная лабораторная;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;

– цилиндр вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°С не более 5 суток, либо при минус (20±3)°С, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

7.1. *Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.*

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25)°С.

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

Лиофилизированные компоненты должны быть восстановлены, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами хранить при (2-8) °С.

Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.

Раствор ТМБ готов для использования. Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

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

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, раствор ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

Посуду (ванночки), используемые для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

В случае повторного использования посуду (ванночки) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки) для раствора ТМБ сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов

7.2.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см таблицу) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

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

7.2.2. Контрольные образцы

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

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

7.2.3. Растворы конъюгата

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

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

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

Тщательно взболтать содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (РК).

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество (см таблицу) концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Раствор конъюгата в рабочем разведении												
Концентрированный раствор конъюгата, мкл	α*	2×α	3×α	4×α	5×α	6×α	7×α	8×α	9×α	10×α	11×α	12×α
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Раствор ТМБ												
Раствор ТМБ, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

α*= 70 мкл

7.2.4. Раствор ТМБ

Внимание! Раствор ТМБ готов к применению.

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

Непосредственно перед использованием в пластиковую ванночку отобрать только необходимое в соответствии с числом используемых стрипов количество раствора ТМБ (см таблицу). Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).

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

7.3. Проведение анализа

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при (2-8)°С до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1.), контрольные образцы (п. 7.2.2.), концентрированный раствор конъюгата (п. 7.2.3.).

Внимание! Концентрированный раствор конъюгата должен быть приготовлен, как минимум, за 15 мин до постановки ИФА и выдержан при температуре (18-25)℃.

7.3.2. Перед постановкой ИФА лунки стрипов промыть один раз промывочным раствором, заливая в каждую лунку по 400 мкл промывочного раствора. По истечении 5 мин раствор аккуратно удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором.

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

7.3.3. Во все лунки стрипов внести по 80 мкл – разводящего буфера для сывороток (РБС); В одну лунку внести 20 мкл положительного контрольного образца ($К^+$), в две другие лунки по 20 мкл отрицательного контрольного образца ($К^-$), в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов, получая таким образом, разведение 1:5. Внесение образцов должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).

Лунки заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при температуре (37±1)°С.

За 5 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении.

7.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

Внимание! Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

7.3.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Заклеить лунки пленкой и инкубировать 30 мин при температуре (37±1) °С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промыть 5 раз промывочным раствором и удалить влагу, как описано выше.

7.3.6. Во все лунки внести по 100 мкл раствора ТМБ.

Внимание! Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Стрипы поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре (18-25)°С.

7.3.7. Остановить реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты измерить оптическую плотность (ОП).

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом не более 0,25 ($ОП_{ср}К^{-} \leq 0{,}25$);

– значение ОП в лунке с положительным контрольным образцом не менее 0,6 ($ОПК^{+} \geq 0{,}60$).

Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$\mathbf{ОП_{крит} = ОП_{ср}(К^{-}) + 0{,}3}$$

где $ОП_{ср}(К^{-})$ — среднее значение ОП для отрицательного контрольного образца.

Исследуемый образец оценить как:

– отрицательный, т.е. не содержащий IgG к *Mycoplasma hominis*, если полученное для него значение $ОП_{обр} \leq О\ ОП_{крит} - 0{,}05$;

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

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

9.2. Интерпретация результатов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Оптическая плотность образца	Результат	Титр IgG
от 0 до ($ОП_{крит}$ – 0,05)	отрицательный	–
от ($ОП_{крит}$ – 0,05) до ($ОП_{крит}$ + 0,05)	сомнительный	–
от ($ОП_{крит}$ + 0,05) до 2×$ОП_{крит}$	слабоположительный	1:5
от 2×$ОП_{крит}$ до 4×$ОП_{крит}$	положительный	1:10
от 4×$ОП_{крит}$ до 8×$ОП_{крит}$	сильноположительный	1:20
от 8×$ОП_{крит}$ до 11×$ОП_{крит}$	сильноположительный	1:40
более 11×$ОП_{крит}$	сильноположительный	1:80

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

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

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru