«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«26» 05 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к *Mycoplasma pneumoniae* «Mycoplasma pneumoniae-IgG-ИФА-БЕСТ»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к *Mycoplasma pneumoniae* «Mycoplasma pneumoniae-IgG-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к *Mycoplasma pneumoniae* в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор реагентов рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможно дробное использование набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации происходит связывание иммуноглобулинов класса G (IgG) к *Mycoplasma pneumoniae (M. pneumoniae),* содержащихся в исследуемых образцах сывороток крови, с иммобилизованными на поверхности лунок планшета рекомбинантными антигенами *M. pneumoniae*. На втором этапе антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена, связываются с комплексом «антиген-антитело». Во время третьей инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы «антиген-антитело-конъюгат». Степень окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце IgG к *M. pneumoniae*. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты ИФА регистрируются измерением оптической плотности (ОП) в лунках планшета.

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

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) *Описание*	Кол-во при комплектации	
	конъюгатом	конъюгатом, концентратом
Планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами *M. pneumoniae*	1 шт.	1 шт.
Положительный контрольный образец ($К^+$) *Содержит* IgG *к M. pneumoniae.* *Содержит натрия мертиолят (0,02%).*	1 фл., 0,5 мл	1 фл., 0,5 мл
Отрицательный контрольный образец ($К^-$) *Не содержит* IgG *к M. pneumoniae.* *Содержит натрия азид (0,1 %).*	1 фл., 1,0 мл	1 фл., 1,0 мл
Конъюгат *Конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена.* *Содержит фенол (0,12%), ProClin 150 (0,01%).*	1 фл., 13,0 мл	-
Конъюгат, концентрат *Конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена.* *Содержит фенол (0,08%), ProClin 150 (0,044%)*	-	1 фл., 1,5 мл
Раствор для разведения конъюгата (РК) *Содержит фенол (0,125 %).*	-	1 фл., 13,0 мл
Раствор для разведения сывороток (РС) *Содержит натрия азид (0,1 %).*	1 фл., 13,0 мл	1 фл., 13,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) *Содержит ProClin 300 (0,25 %).*	1 фл., 28,0 мл	1 фл., 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) *Содержит 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (0,025 %).*	1 фл., 13,0 мл	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент *Содержит кислоту серную (4,9 %).*	1 фл., 12,0 мл	1 фл., 12,0 мл
Пленки для заклеивания планшетов	3 шт.	3 шт.
Наконечники для дозаторов на 2-200 мкл	16 шт.	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.	2 шт.

3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая чувствительность выявления IgG к *Mycoplasma pneumoniae:* клинические испытания, проведенные на 104 положительных образцах сыворотки крови, показали 100 % чувствительность (интервал 97,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.2. Диагностическая специфичность выявления IgG к *Mycoplasma pneumoniae:* клинические испытания, проведенные на 64 отрицательных образцах сыворотки крови, показали 100 % специфичность (интервал 95,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

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

4.3. Стоп-реагент, раствор ТМБ обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента, раствора ТМБ на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды. Некоторые компоненты содержат натрия азид, натрия мертиолят, фенол, ProClin 300, ProClin 150 в концентрациях, указанных в п. 2.2 «Состав набора».

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

4.4. При работе с исследуемыми и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

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

– спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при одной длине волны - 450 нм;

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

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

– дозаторы одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать

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

объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл;

– дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 10 до 300 мкл;

– перчатки медицинские диагностические одноразовые;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– дезинфицирующие средства.

– бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором, и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

6.2. Для анализа использовать образцы сыворотки крови человека или образцы плазмы крови, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия, гепарина, ЭДТА.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови хранить при температуре (2-8) °С не более 5 суток или при температуре минус 18 °С и ниже, если требуется более длительное хранение.

После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сыворотки или плазмы крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

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

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

- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18-26) °С не менее 30 минут.

- При дробном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре (2-8) °С, использовать в течение всего срока годности. Допускается хранение ФСБ-Т×25 и стоп-регента при температуре (2-30) °С.

- Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.

- Необходимо избегать воздействия прямого солнечного света на раствор ТМБ при подготовке и проведении ИФА.

- 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 в наборах АО «Вектор-Бест».

- Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

- Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

- При использовании устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.

- Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, 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.

- В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки) для раствора ТМБ ополоснуть водой, промыть 70 % раствором этилового спирта и тщательно отмыть дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду (ванночки) дез-

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

инфицирующими растворами и моющими средствами.

- Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70 % раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Перемешать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей необходимо прогреть его при температуре (30–40) °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой, тщательно перемешать.

<u>Хранение:</u> при температуре (2-8) ºС не более 1 месяца или при (18-26) ºС не более 7 суток.

Таблица расхода компонентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор												
ФСБ-Т×25, мл	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	14,0	16,0	18,0	20,0	22,0	флакон
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 700
Раствор конъюгата в рабочем разведении												
Конъюгат, концентрат, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,3
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	флакон
Конъюгат, готовый к использованию												
Конъюгат, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	флакон
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	флакон

7.4. Конъюгат.

При комплектации набора конъюгатом, готовым к использованию: в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

При комплектации набора концентратом конъюгата: приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении.

Отобрать в ванночку для реагента необходимое количество (см. таблицу расхода

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

компонентов) концентрата конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

Хранение: раствор конъюгата в рабочем разведении стабилен до 10 часов при температуре (18-26) °С.

7.5. Раствор ТМБ.

Раствор ТМБ готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ.

7.6. Контрольные образцы ($К^+$ и $К^–$) и стоп-реагент готовы к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Перед постановкой ИФА лунки стрипов промыть один раз промывочным раствором, заливая в каждую лунку не менее 400 мкл промывочного раствора. По истечении 5 минут раствор удалить. Остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге. Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями при постановке реакции.

8.2. Во все лунки стрипов внести по 80 мкл РС.

В одну лунку внести 20 мкл $К^+$, в две другие лунки по 20 мкл $К^–$, в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов, получая таким образом, разведение 1:5. Внесение контрольных и исследуемых образцов должно сопровождаться тщательным перемешиванием путем пипетирования. При этом происходит изменение цвета с красно-желтого на розовый. Время внесения образцов не должно превышать 10 минут.

Стрипы заклеить плёнкой и инкубировать при температуре (37±1) °С 30 минут.

8.3. По окончании инкубации снять плёнку и поместить её в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором (см. п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок стрипов. В каждую лунку вносить 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 секунд. По окончании промывки необходимо использовать перекрестную аспирацию раствора из лунок *(режим «crosswise» или «cross aspiration»)* или тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевёрнутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл готового к использованию конъюгата или по 100 мкл конъюгата в рабочем разведении (см. п. 7.4), заклеить стрипы плёнкой и инкубировать при температуре (37±1) °С 30 минут.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным конъюгатом).***

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

8.5. По окончании второй инкубации промыть лунки, как указано в п. 8.3.

8.6. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора ТМБ (см. п. 7.5) и инкубировать при температуре (18-26) °С в защищённом от прямого солнечного света месте 25 минут.

Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).***

8.7. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

8.8. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм. Допускается измерение при одной длине волны – 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 минут.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср.}К^-$).

9.2. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий**:**

– среднее значение ОП в лунках с $К^-$ не более 0,2;

– значение ОП в лунке с $К^+$ не менее 0,7.

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

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср.}К^- + 0{,}4$$

9.4. Исследуемый образец расценивать как:

– отрицательный, если соответствующее ему значение $ОП_{обр.} < ОП_{крит} \times 0{,}9$;

– положительный, если значение $ОП_{обр.} \geq ОП_{крит.} \times 1{,}1$;

– сомнительный, если $ОП_{крит.} \times 0{,}9 \leq ОП_{обр.} < ОП_{крит.} \times 1{,}1$ («серая зона»: $ОП_{крит.} \pm 10\%$).

При получении сомнительного результата требуется повторно исследовать этот образец для исключения ошибки на аналитическом этапе.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться

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

при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. Набор предназначен для однократного применения.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора **«Mycoplasma pneumoniae-IgG-ИФА-БЕСТ»,** 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