

**ИНСТРУКЦИЯ**  
по применению набора реагентов

Набор реагентов для выявления антител класса IgM  
к *Mycoplasma pneumoniae* методом иммуноферментного анализа  
**ИФА-Мико-пневмо-IgM**

## НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление видоспецифических антител класса IgM к *Mycoplasma pneumoniae* в сыворотке (плазме) крови людей методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

## СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	лизатный инактивированный очищенный антиген <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , сорбированный на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном (используются "ломающиеся" стрипы)	1 планшет
	<i>допускается отдельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)</i>	
Контрольный положительный образец (K <sup>+</sup> )	инактивированный; прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный образец уровня среза (K <sup>+</sup> <sub>пор</sub> )	инактивированный; прозрачная жидкость желтого цвета	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный отрицательный образец (K <sup>-</sup> )	инактивированный; прозрачная жидкость зеленого цвета	1 фл. (1,2 мл)
Конъюгат	антитела диагностические мышинные против иммуноглобулинов человека класса IgM, меченые пероксидазой; прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (13 мл)
Раствор для разведения образцов (PPO)	прозрачная жидкость синего цвета	1 фл. (60 мл) или 2 фл. (по 30 мл)
Блокирующий раствор (БР)	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (7,5 мл)
25-кратный концентрат промывочного раствора [ПР(x25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	1 фл. (80 мл) или 2 фл. (по 40 мл)
Раствор индикаторный (РИ);	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13 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. ПР(х25), РИ, РРО, 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 (16 шт.),  
клеякой 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 одномоментное исследование 96 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 6 лунок и 1 лунка – для выведения уровня "бланк" спектрофотометра). Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Число иссл. обр.	1	2-9	10-17	18-25	26-33	34-41	42-49	50-57	58-65	66-73	74-81	82-89

### **ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ**

При наличии в исследуемом образце антител класса IgM к *Mycoplasma pneumoniae* они связываются с антигеном, сорбированным на поверхности лунок полистиролового планшета, этот комплекс, в свою очередь, связывается с конъюгатом – антителами против IgM человека, мечеными пероксидазой хрена. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело-конъюгат" выявляется по реакции с субстратом пероксидазы – тетраметилбензидином, в результате которой бесцветное содержимое лунок приобретает голубой цвет, изменение цвета регистрируется по оптической плотности раствора в лунке планшета с помощью спектрофотометра.

### **АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

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

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

### **ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

Сыворотка (плазма) крови человека объемом не менее 10 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.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

## **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 рабочих разведений исследуемых образцов**

По 10 мкл каждого образца смешать с 0,5 мл РРО. 0,075 мл полученного разведения смешать с 0,075 мл БР (разведение 1:100), тщательно перемешать пипетированием, выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

### **Приготовление рабочего промывочного раствора (ПР)**

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

При постановках с использованием ИФА-анализаторов 80 мл ПР(х25) довести водой очищенной до 2 л.

При дробной "ручной" постановке использовать соотношения объемов ПР(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	12
ПР(х25), мл	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищенная, мл	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

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

### **Приготовление остальных реагентов**

Иммуносорбент, К<sup>-</sup>, К<sup>+</sup>, К<sup>+</sup><sub>пор</sub>, РРО, БР, 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.

## **7.2. Проведение анализа ("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.

2. Внести (соблюдая указанную последовательность):

в одну лунку (например, А1) - 100 мкл РРО;

в две лунки (например, В1, С1) – по 100 мкл К<sup>+</sup>,

в две лунки (например, D1, E1) – по 100 мкл К<sup>+</sup><sub>пор</sub>,

в две лунки (например, F1, G1) – по 100 мкл К<sup>-</sup>,

в следующие лунки – по 100 мкл подготовленных исследуемых образцов (по 1 лунке на образец).

3. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой. Инкубировать 30 мин при температуре от 21 до 25°C в защищенном от света месте.

4. С помощью промывателя удалить жидкость из лунок, 4 раза промыть планшет ПР, внося в лунки 350-370 мкл раствора. При ручной отмывке внесенный в лунки ПР необходимо выдерживать не менее 30 с. 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.

5. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата.

6. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой. Инкубировать 30 мин при температуре от 21 до 25°C в защищенном от света месте.

7. С помощью промывателя удалить жидкость из лунок, 4 раза промыть планшет ПР, как указано в п. 4.

8. Во все лунки внести по 100 мкл РИ, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и инкубировать 10 мин при температуре от 21 до 25°C.

9. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился индикаторный раствор) внести по 100 мкл стоп-реактанта, 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 двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по лунке А1.

Результаты ИФА учитывать при следующих условиях:

среднее значение ОП в лунках с K<sup>+</sup> не менее 0,6;

среднее значение ОП в лунках с K<sup>+</sup><sub>пор</sub> не менее 0,2;

среднее значение ОП в лунках с K<sup>-</sup> не более 0,15.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Исследуемые образцы учитываются:

как положительные при ОП выше  $1,1 \times (\text{ОП}_{\text{K}^+\text{пор}})$ ,

как отрицательные при ОП ниже  $0,9 \times (\text{ОП}_{\text{K}^+\text{пор}})$ .

При ОП исследуемого образца, лежащей в диапазоне от  $0,9 \times (\text{ОП}_{\text{K}^+\text{пор}})$  до  $1,1 \times (\text{ОП}_{\text{K}^+\text{пор}})$ , образцы должны быть исследованы повторно. При повторном получении таких результатов рекомендуется мониторинг иммунного статуса пациента для исключения неспецифических, в том числе перекрестных реакций, приводящих к сомнительным результатам.

## **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.

**КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА  
("ИФА-Мико-пневмо-IgM")**

<b><u>Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!</u></b>	
<b>Внести</b>	в лунку А1 – 100 мкл РРО; в лунки В1, С1 – по 100 мкл К <sup>+</sup> , в лунки D1, Е1 – по 100 мкл К <sup>+</sup> <sub>пор</sub> , в лунки F1, G1 – по 100 мкл К <sup>-</sup> , в следующие лунки - по 100 мкл подготовленных исследуемых образцов (по 1 лунке на образец)
<b>Инкубация</b>	30 мин, 21-25 °С
<b>Промыть</b>	4 раза промывочным раствором
<b>Внести</b>	по 100 мкл конъюгата в каждую лунку
<b>Инкубация</b>	30 мин, 21-25 °С
<b>Промыть</b>	4 раза промывочным раствором
<b>Внести</b>	по 100 мкл индикаторного раствора в каждую лунку
<b>Инкубация</b>	10 - 15 мин, 21-25 °С
<b>Внести</b>	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
<b>Измерить</b>	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по лунке А1

*апрель 2015 г.*