

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgM АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ MYCOPLASMA SPP. В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «Mycoplasma IgM-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Микоплазмы (*Mycoplasma*) являются отдельным классом микроорганизмов. Из-за особенностей метаболизма микоплазмы не растут или крайне медленно растут на стандартных средах, используемых в бактериологических лабораториях; это требует применения серологических методов для диагностики. В практической медицине основную роль играют виды *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*. Все эти виды несут общие антигенные детерминанты; кроме того, значительный перекрест наблюдается с родственным видом *Ureaplasma urealyticum*. *Mycoplasma pneumoniae* вызывает пневмонию, трахеобронхит и буллезный менингит. Остальные микоплазмы могут вызывать острые и хронические воспалительные заболевания мочеполового тракта и быть причиной мужского и женского бесплодия.

1.3. Серологическая диагностика основана на выявлении антител классов IgA, IgM и IgG к антигенам *Mycoplasma spp.* Выработка антител класса IgM начинается в первые 6-7 дней заболевания, затем их количество нарастает в течение двух-четырёх недель, впоследствии постепенно снижаясь. На второй неделе заболевания начинается выработка антител класса IgG. В некоторых случаях антитела класса IgM могут сохраняться в сыворотке крови в течение нескольких месяцев, а также у лиц – носителей инфекции без клинических симптомов заболевания. В случае обнаружения антител класса IgM рекомендуется повторное их определение в свежем образце крови в целях определения нарастания их количества в процессе заболевания. Следует отметить, что у пациентов со слабым иммунным ответом на воздействие возбудителя *Mycoplasma spp.*, у беременных женщин антитела данного класса могут не определяться при наличии инфицирования. Поэтому рекомендуется дополнительное определение и подтверждение возбудителя микоплазмоза методом полимеразной цепной реакции.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgM антител к антигенам *Mycoplasma spp.* основано на использовании непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизован антиген – *Mycoplasma*. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к IgM 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 концентрации специфических IgM антител к антигенам *Mycoplasma spp.* Концентрация IgM антител к антигенам *Mycoplasma spp.* в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания IgM антител к антигенам *Mycoplasma spp.* в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «*Mycoplasma* IgM-ИФА» не превышает 8.0%.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P106Z	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	CN106MZ CP106MZ	Контрольные сыворотки (отрицательный и положительный контроль) на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgM антител к антигенам Mucorplasma spp., готовы к использованию (0.5 мл и 0.5 мл соответственно)	2	шт.	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
3	T106MZ	Конъюгат, готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
4	S011Z	ИФА-Буфер, готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
5	R055Z	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	Концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	Стоп-реагент, готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
9	K106MI	Инструкция по применению Набора реагентов «Mucorplasma IgM-ИФА»	1	шт.	-
10	K106MQ	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Mucorplasma IgM-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. 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.

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

5.4. 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.

5.5. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

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

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 10–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки 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, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «Mycoplasma IgM-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 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 46 исследуемых образцов и 2 пробы 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;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочную пробу 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 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток;

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

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, 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. Допускается исследование сывороток, хранение которых с момента забора крови осуществлялось при температуре от +2 °С до +8 °С не более 7 суток.

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. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации IgM антител к антигенам *Mycoplasma spp.* в контрольной сыворотке.

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

8.8. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов - исследуемые образцы в 2 повторах и 4 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Внесите во все лунки планшета по 90 мкл ИФА-Буфера.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл контрольных сывороток . В остальные лунки внесите в дубликатах по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови . Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
4	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37°C.
5	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.
6	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата .
7	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37°C .
8	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз .
9	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина . Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °C) в течение 10-20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
10	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.
11	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.

<p>12</p> <p>Рассчитайте содержание IgM антител к антигенам Mусорiplasma spp. в исследуемых образцах.</p> <p>1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля:</p> $\text{ОП (CN106MZ)Ср} = (\text{ОП1 (CN106MZ)} + \text{ОП2 (CN106MZ)} + \text{ОП3 (CN106MZ)}) / 3;$ <p>Результаты анализа считать достоверными, если:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ОП Положительного контроля не ниже 1.5 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. $\text{ОП (CN106MZ)Ср} \times 0.5 < \text{ОПn (CN106MZ)} < \text{ОП (CN106MZ)Ср} \times 2.0$. <p>Если одно из значений Отрицательного контроля выходит за пределы этого интервала, то его значение не участвует в расчете ОП (CN106MZ)Ср</p> <p>2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.2.</p> $\text{Cut off} = \text{ОП (CN106MZ)Ср} + 0.2$ <p>3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off.</p> $\text{ИП} = \text{ОПобразца} / \text{Cut off}$

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 определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Интерпретация результатов:

**При ИП > 1.1 образец положительный,
При ИП < 0.9 - 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.

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Maia I. L., Nicolau J. C., Machado M. de N., Maia L. N., Takakura I. T., Rocha P. R., Cordeiro J. A., Ramires J. A. – Prevalence of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae in different forms of coronary disease. Arq Bras Cardiol. 2009 Jun; 92(6): 405-11, 422-8, 439-45. English, Multiple languages.
2. Pereyre S., Renaudin H., Touati A., Charron A., Peuchant O., Hassen A. B., Bébéar C, Bébéar CM. – Detection and susceptibility testing of Mycoplasma amphoriforme isolates from patients with respiratory tract infections. Clin Microbiol Infect. 2009 Jul 15. [Epub ahead of print]
3. Ken B. Waites and Deborah F. Talkington – Mycoplasma pneumoniae and Its Role as a Human Pathogen. Clin. Microbiol. Rev., Oct 2004; 17: 697 – 728.