

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ  
КЛАССА G M, A к Ureaplasma urealyticum.  
"Уреаплазма-антитела"**

Настоящая инструкция распространяется на "Уреаплазма - антитела" - тест-систему иммуноферментную, предназначенную для выявления индивидуальных антител класса G, M A к Ureaplasma urealyticum методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе.

Набор состоит из 10 реагентов:

1. Иммуносорбент – смесь рекомбинантных антигенов микоплазмы, сорбированных в лунках планшета;
2. Фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСБ-Т), 25х концентрат, – прозрачная, слегка опалесцирующая, бесцветная жидкость;
3. Разводящий буферный раствор для сывороток (РБР-С) – прозрачная опалесцирующая жидкость фиолетового цвета;
4. Раствор конъюгата моноклональных антител мыши к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (**PKr- IgG**) – прозрачная опалесцирующая жидкость **зелёного** цвета;
5. Раствор конъюгата моноклональных антител мыши к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (**PKr- IgM**) – прозрачная опалесцирующая жидкость **синего** цвета;
6. Раствор конъюгата моноклональных антител мыши к IgA человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (**PKr- IgA**) – прозрачная опалесцирующая жидкость **жёлтого** цвета;
7. Положительный контрольный образец (**K+G/A**) – инактивированная сыворотка крови человека, содержащая антитела классов G и A к уреаплазме - прозрачная, слегка опалесцирующая, жидкость **красного** цвета;
8. Положительный контрольный образец (**K+ IgM**) – инактивированная сыворотка крови человека, содержащая антитела классов M к уреаплазме - прозрачная, слегка опалесцирующая, жидкость **синего** цвета;
9. Отрицательный контрольный образец (**K-**) - инактивированная сыворотка крови человека, не содержащая специфических антител к уреаплазме – прозрачная, слегка опалесцирующая, жидкость **жёлтого** цвета;
10. Хромоген – тетраметилбензидин - субстрат (**ТМБ –субстрат**) – бесцветная или светло-желтого цвета жидкость;
11. **Стоп-реагент** – прозрачная бесцветная жидкость.

Тест-система "Уреаплазма-антитела" рассчитана на 96 определений, включая контрольные образцы.

**Назначение**

Тест-система предназначена для выявления индивидуальных специфических антител класса G или класса M, или класса A к уреаплазме в сыворотке (плазме) крови человека.

**Способ применения**

**1. Приготовление реагентов и исследуемого материала**

**1.1 Приготовление ФСБ-Т**

При наличии во флаконе с ФСБ-Т осадка солей флакон с концентратом выдержать при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  до полного растворения солей.

Содержимое одного флакона с ФСБ-Т перенести в мерный цилиндр вместимостью 1 л и довести объем раствора до 650 мл дистиллированной водой.

Хранение: неиспользованный концентрат ФСБ-Т в течение срока годности набора при температуре от 2 до 8  $^\circ\text{C}$ , раствор ФСБ-Т – в течение месяца при температуре от 2 до 8  $^\circ\text{C}$ .

При использовании одного или нескольких стрипов планшета необходимое количество ФСБ-Т готовится в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

|              |                                | Количество используемых стрипов |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|              |                                | 1                               | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         | 7         | 8         | 9         | 10        | 11        | 12        |
| Объем,<br>мл | Концентрат<br>ФСБ-Т, мл        | 2                               | 4         | 6         | 8         | 10        | 12        | 14        | 16        | 18        | 20        | 22        | 26        |
|              | Вода дистил-<br>лированная, мл | до<br>50                        | до<br>100 | до<br>150 | до<br>200 | до<br>250 | до<br>300 | до<br>350 | до<br>400 | до<br>450 | до<br>500 | до<br>550 | до<br>650 |

**1.2 Подготовка РБР-С, PKr-IgG, PKr-IgM, PKr-IgA, ТМБ-субстрат**

РБР-С, PKr-IgG, PKr-IgM, PKr-IgA, ТМБ-субстрат – готовы к использованию

Хранение: неиспользованные РБР-С, PKr-IgG, PKr-IgM, PKr-IgA, ТМБ-субстрат хранят в течение срока годности набора при температуре от 2 до 8  $^\circ\text{C}$ .

**При работе с ТМБ-субстратом и раствором конъюгата (PKr) необходимо отбирать раствор непосредственно из флакона новыми наконечниками.**

**1.3 Подготовка контрольных сывороток**

K-, K+ - готовы к использованию.

Хранение: после вскрытия флакона до 48 ч при температуре от 20 до 25  $^\circ\text{C}$  и в течение срока годности набора при температуре от 2 до 8  $^\circ\text{C}$ .

**1.4 Подготовка стоп- реагента**

Стоп- реагент готов к использованию.

Хранение: не ограничено.

**2. Подготовка исследуемых сывороток**

Для выявления антител класса G, M, A к уреаплазме использовать сыворотку (плазму) крови человека как свежеприготовленную, так и хранившуюся в течение 24 ч при температуре от 2 до 8  $^\circ\text{C}$  или в течение трех месяцев при температуре минус 20  $^\circ\text{C}$ .

Для проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы крови человека объемом не менее 50 мкл. Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность бактериального пророста. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования. Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией. Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов. Не допускать тестирование пула, содержащего несколько образцов сывороток.

Каждый образец сыворотки или раствора необходимо отбирать новым наконечником. Для отбора исследуемых проб и компонентов применять автоматические пипетки с погрешностью измерения объема не более 2 %.

### 3. Проведение ИФА

#### I. Выявление антител класса IgG

Комплект перед проведением анализа выдержать в течение 30 мин при температуре от 20 до 25° С.

3.1 Планшет промыть один раз ФСБ-Т, при этом в каждую лунку планшета внести от 200 до 250 мкл раствора. По окончании промывки остатки жидкости удалить активным встряхиванием, постукивая планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

3.2. Для внесения контрольных сывороток можно использовать любые лунки планшета. Для этого в лунку внести по 100 мкл К+, в две другие лунки планшета - по 100 мкл К-. В остальные лунки планшета внести по 100 мкл РБР-С.. *При постановке ИФА на одном стрипе допускается использовать для К- и К+ - по одной лунке.*

В остальные лунки планшета внести по **20 мкл** исследуемых сывороток. Раствор перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РБР-С должен измениться.

После этого планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1)°С.

3.3. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

3.4. После промывки и удаления влаги в каждую лунку планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата против иммуноглобулинов G человека (PKg-IgG) **зелёного цвета**. Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1)°С.

3.5. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

3.6. Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл раствора ТМБ- субстрата.

Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре (37±1)°С.

3.7. Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

#### Учет результатов

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху. Результаты учитывают только в том случае, если в лунках с К- среднее значение ОП (ОПК-) не более 0,2, а в лунках с К+ среднее значение ОП (ОПК+) не менее 1,0.

Рассчитывают ОПкрит. по формуле:

$$\text{ОПкрит.} = \text{ОПК-(ср.)} + 0,2,$$

где ОПК-(ср.) – среднее значение ОП (ОПК-) по двум лункам.

Если значение оптической плотности исследуемого образца ОПиссл. ≤ 0,9хОПкрит, то результат анализа считают отрицательным, IgG к уреаплазме не определены.

Если ОПиссл. попадает в интервал от 0,9хОПкрит до 1,2хОПкрит, то результат анализа сомнительный. Рекомендуется повторить анализ такой сыворотки.

Если ОПиссл. > 1,2хОПкрит, то результат анализа исследуемого образца считают положительным. Присутствие IgG к уреаплазме отражает наличие текущей или перенесенной ранее инфекции.

#### II. Выявление антител класса IgM

3.1 Планшет промыть один раз ФСБ-Т, при этом в каждую лунку планшета внести от 200 до 250 мкл раствора. По окончании промывки остатки жидкости удалить активным встряхиванием, постукивая планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

3.2. Для внесения контрольных сывороток можно использовать любые лунки планшета. Для этого в лунку внести по 100 мкл К+, в две другие лунки планшета - по 100 мкл К-. В остальные лунки планшета внести по 100 мкл РБР-С.. *При постановке ИФА на одном стрипе допускается использовать для К- и К+ - по одной лунке.*

В остальные лунки планшета внести по **10 мкл** исследуемых сывороток. Раствор перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РБР-С должен измениться.

После этого планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1)°С.

3.3. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

3.4. После промывки и удаления влаги в каждую лунку планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата против иммуноглобулинов M человека (PKg-IgM) **синего цвета**. Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1)°С.

3.5. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

3.6. Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл раствора ТМБ- субстрата.

Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре (37±1)°С.

3.7. Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

#### Учет результатов

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху. Результаты учитывают только в том случае, если в лунках с К- среднее значение ОП (ОПК-) не более 0,2, а в лунках с К+ среднее значение ОП (ОПК+) не менее 0,5

Рассчитывают ОПкрит. по формуле:

$$\text{ОПкрит.} = \text{ОПК-(ср.)} + 0,3,$$

где ОПК-(ср.) – среднее значение ОП (ОПК-) по двум лункам.

Если значение оптической плотности исследуемого образца ОПиссл.  $\leq 0,9 \times \text{ОПКрит}$ , то результат анализа считают отрицательным.

Если ОПиссл. попадает в интервал от  $0,9 \times \text{ОПКрит}$  до  $1,2 \times \text{ОПКрит}$ , то результат анализа сомнительный. Рекомендуется повторить анализ такой сыворотки. При повторном сомнительном результате необходимо проанализировать сыворотку, полученную через 10-15 дней на наличие IgM и IgG антител и параллельно с 1-м образцом сыворотки проследить увеличение концентрации IgM. При увеличении концентрации IgM или выявлении IgG антител результат считают положительным.

Если значение оптической плотности исследуемого образца ОПиссл.  $> 1,2 \times \text{ОПКрит}$ , то результат анализа считают положительным. При анализе парных сывороток для контроля изменения концентрации IgM или наличия сероконверсии оба образца должны быть тестированы в дубликate одновременно во время одной постановки.

### III. Выявление антител класса IgA

Комплект перед проведением анализа выдержать в течение 30 мин при температуре от 20 до 25° С.

3.1 Планшет промыть один раз ФСБ-Т, при этом в каждую лунку планшета внести от 200 до 250 мкл раствора. По окончании промывки остатки жидкости удалить активным встряхиванием, постукивая планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

3.2. Для внесения контрольных сывороток можно использовать любые лунки планшета. Для этого в лунку внести по 100 мкл К+, в две другие лунки планшета - по 100 мкл К-. В остальные лунки планшета внести по 100 мкл РБР-С. *При постановке ИФА на одном стрипе допускается использовать для К- и К+ - по одной лунке.*

В остальные лунки планшета внести по **10 мкл** исследуемых сывороток. Раствор перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РБР-С должен измениться.

После этого планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре  $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$ .

3.3. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

3.4. После промывки и удаления влаги в каждую лунку планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата против иммуноглобулинов А человека (РКг-IgA) **жёлтого цвета**. Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре  $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$ .

3.5. По окончании инкубации планшет промыть ФСБ-Т пять раз, как описано в п.3.1.

3.6. Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл раствора ТМБ- субстрата.

Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре  $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$ .

3.7. Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

### 4. Учет результатов

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху. Результаты учитывают только в том случае, если в лунках с К- среднее значение ОП (ОПК-) не более 0,2, а в лунках с К+ среднее значение ОП (ОПК+) не менее 1,0.

Рассчитывают ОПКрит. по формуле:

$$\text{ОПКрит.} = \text{ОПК-(ср.)} + 0,2,$$

где ОПК-(ср.) – среднее значение ОП (ОПК-) по двум лункам.

Если значение оптической плотности исследуемого образца ОПиссл.  $\leq 0,9 \times \text{ОПКрит}$ , то результат анализа считают отрицательным, IgA к уреаплазме не определены.

Если ОПиссл. попадает в интервал от  $0,9 \times \text{ОПКрит}$  до  $1,2 \times \text{ОПКрит}$ , то результат анализа сомнительный. Рекомендуется повторить анализ такой сыворотки.

Если ОПиссл.  $> 1,2 \times \text{ОПКрит}$ , то результат анализа исследуемого образца считают положительным. Присутствие IgA к уреаплазме отражает наличие текущей или реинфекции.

### 5. Форма выпуска

Тест-систему "Уреаплазма-антитела" выпускают в виде набора, упакованного в коробку из картона, куда вкладывают инструкцию по применению.

Набор состоит из следующих компонентов: иммуносорбент, запаянный в пластиковый пакет, – 1 шт.; ФСБ-Т, 25х концентрат, по 26 мл - 1 флакон; РБР-С по 12 мл - 1 флакон; РКг-IgG по 12мл – 1 флакон; РКг-IgM по 12мл – 1 флакон; РКг-IgA по 12мл – 1 флакон; К+ по 1,5 мл – 1 флакон; К- по 2.5 мл - 1 флакон; ТМБ- субстрат по 12 мл – 1 флакон; стоп-реагент по 6 мл - 1 флакон.

### 6. Срок годности, условия хранения и транспортирования

Срок годности набора 12 месяцев.

Хранение при температуре от 2 до 8° С.

Транспортирование производить при температуре от 2 до 8° С. Допускается транспортирование при температуре не выше + 27 °С в течение 5 дней.

Не допускать замораживания.

## 7. Краткая схема проведения ИФА.

| № п/п | Наименование операции  | Время и температура инкубации     |
|-------|--|-----------------------------------|
| 1.    | Промыть однократным ФСБТ – 1 раз   | Комнатная температура (18- 25° С) |
| 2.    | Внести по 100 мкл К+, К-,<br>по 100 мкл РБР-С и<br>а.) для выявления антител класса IgG внести по 20 мкл анализируемых образцов.,<br>б.) для выявления антител класса IgM внести по 10 мкл анализируемых образцов.,<br>в.) для выявления антител класса IgA внести по 10 мкл анализируемых образцов.                             | 30 мин. при температуре 37° С     |
| 3.    | Промыть однократным ФСБТ – 5 раз   | Комнатная температура (18- 25° С) |
| 4.    | Внести по 100 мкл:<br>а.) для выявления антител класса IgG внести по 100 мкл раствора конъюгата РКг-IgG зелёного цвета.,<br>б.) для выявления антител класса IgM внести по 100 мкл раствора конъюгата РКг-IgM синего цвета.,<br>в.) для выявления антител класса IgA внести по 100 мкл раствора конъюгата РКг-IgA жёлтого цвета. | 30 мин. при температуре 37° С     |
| 5.    | Промыть однократным ФСБТ – 5 раз   | Комнатная температура (18- 25° С) |
| 6.    | Внести по 100 мкл ТМБ-субстрата  | 15 мин. при температуре 37° С     |
| 7.    | Внести по 50 мкл стоп-реагента   | Комнатная температура (18- 25° С) |
| 8.    | Измерить ОП при 450 нм   | Комнатная температура (18- 25° С) |

## 7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПРИ РАБОТЕ С ИФА ТЕСТ-СИСТЕМАМИ

### 7.1. Общие рекомендации.

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
  - не пипетировать растворы ртом;
  - все использованные материалы подвергать обработке 6%-ным раствором перекиси водорода (не менее 6 часов).
- Необходимо предъявлять высокие требования к чистоте лабораторной посуды, наконечников, ванночек и т.п., поскольку даже следы применяемых дезинфицирующих и моющих средств приводят к искажению результатов ИФА.
- Предпочтительно использование одноразовой посуды.
  - При многократном использовании контейнера или ванночки для компонента их следует использовать всегда для одного и того же реагента, при повторном применении следует тщательно промыть дистиллированной водой до и после каждого использования.
  - Для работы с набором следует использовать дистиллированную воду высокого качества, так как компоненты набора очень чувствительны к микробиологическому загрязнению, хлорноватистой кислоте и ароматическим хлорсоединениям, ионам металлов, зачастую находящихся в воде.
  - При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий.
  - При использовании автоматического вошера или гребёнки ёмкость и шланги для промывочного раствора рекомендуется 1 раз в неделю обрабатывать 70%-ным спиртом с последующей отмывкой дистиллированной водой.

### 7.2. Требования к анализируемым образцам.

- Для проведения ИФА не рекомендуется использовать гемолизированные, гиперлипидные или повторно замороженные сыворотки.
- Допускается хранение образцов сывороток при 2-8°С в течение 48 часов, либо при температуре минус 20°С в течение 3 месяцев.
- После размораживания образцы тщательно перемешать.
- При необходимости образцы очистить центрифугированием при 5-10 тыс.об/мин.

### 7.3. Возможные причины снижения чувствительности.

- Уменьшение времени инкубации (как правило, субстратной реакции).
- Использование загрязнённой посуды и наконечников.
- Замачивание посуды и наконечников в перекиси водорода или хлорсодержащих растворах без последующего кипячения в процессе мытья.
- Плохая отмывка после инкубации сывороток.
- Растворы, не нагретые перед постановкой до комнатной температуры.
- Размещение планшет в термостате стопкой.
- Низкая температура в лабораторных комнатах (ниже +18°С).
- Нарушение правил и сроков хранения вскрытых компонентов при дробном использовании набора.

### 7.4. Возможные причины ложноположительных результатов из-за погрешностей постановки

- Плохая отмывка на стадии конъюгата.
- Длительное внесение образцов по отношению к времени инкубации.
- Контаминированный вошер, гребёнка или низкого качества дистиллированная вода.
- Неправильная работа с пипетками.
- Многократное использование наконечников и посуды для ТМБ-субстрата.
- Нерастворённые кристаллы в концентрате отмывающего раствора.
- Сыворотки с бактериальным проростом или с наличием клеточных элементов.