

**Vitrotest**®

# Vitrotest Mycoplasma hominis-IgA

Імуноферментна тест-система для якісного та напівкількісного визначення антитіл класу IgA до *Mycoplasma hominis*

## Інструкція з використання

1. Призначення
2. Клінічне значення
3. Принцип аналізу
4. Матеріали та обладнання
5. Застереження та техніка безпеки
6. Зберігання та стабільність
7. Підготовка зразків
8. Підготовка реагентів
9. Процедура аналізу
10. Облік результатів та їх інтерпретація
11. Діагностичні характеристики тесту
12. Обмеження аналізу

Література

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK025

## «Vitrotest Mycoplasma hominis-IgA» Імуноферментна тест-система для якісного та напівкількісного визначення антитіл класу IgA до *Mycoplasma hominis*

### 1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest Mycoplasma hominis-IgA» призначена для якісного та напівкількісного визначення антитіл класу IgA до *Mycoplasma hominis* у сироватці чи плазмі крові людини.

Тест-набір може бути застосований як для проведення ІФА з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

### 2. Клінічне значення

Мікоплазми є умовними патогенами, оскільки їх часто виявляють у складі нормальної мікрофлори людини. Разом з тим ці мікроорганізми можуть бути залучені в запальний процес при уrogenітальних захворюваннях. Дані про частоту розповсюдження мікоплазм серед населення різних країн суперечливі, а показники інфікованості варіюють від 10 до 80%.

*Mycoplasma hominis* інфікує переважно органи сечостатевої системи та викликає різні деструктивно-запальні процеси. У чоловіків *M.hominis*, зазвичай, викликає уретрити та простатити, а у жінок – уретрити, цервіцити та запальні ураження тазових органів. Особливу небезпеку становить уrogenітальний мікоплазмоз вагітних, оскільки може спричинити невиношування, передчасні пологи, інфікування плода та розвиток постпологового сепсису.

Клінічні прояви, обумовлені присутністю *M.hominis*, часто схожі із симптомами інших захворювань уrogenітального тракту бактерійної, вірусної та інших етіологій. Тому для успішної діагностики уrogenітального мікоплазмозу обов'язково проводять лабораторні дослідження, які дозволяють диференціювати їх.

До серологічних методів діагностики мікоплазмозу відносяться реакції преципітації та імунофлуоресценції. Для виявлення сироваткових антитіл до *M.hominis* використовують реакцію пасивної гемаглютинації та імуноферментний аналіз (ІФА), що дозволяє визначити стадію та характер перебігу хвороби, що особливо важливо при хронічному перебігу захворювання протягом багатьох місяців та років. Антитіла класу IgA до *M.hominis* з'являються у сироватці крові людини у перші декілька тижнів після початку захворювання.

### 3. Принцип аналізу

Визначення антитіл класу IgA до *Mycoplasma hominis* в тест-системі «Vitrotest Mycoplasma hominis-IgA» базується на принципі «непрямого» твердофазного імуноферментного аналізу.

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованими в лунках рекомбінантними антигенами *M.hominis*. Під час інкубації досліджуваних зразків, в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування специфічних до *M.hominis* антитіл з антигеном на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додається кон'югат антивидових (специфічних до антитіл класу IgA) моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, що зв'язується з імуноними комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імуноних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). В результаті реакції розчин в лунках, де утворились імуноні комплекси, забарвлюється в синій колір. Реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту, при цьому синій колір забарвлених лунок змінюється на жовтий. Результат аналізу визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620 нм.

### 4. Матеріали та обладнання

#### 4.1 Склад набору

**ІФА-планшет** – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок) з іммобілізованими рекомбінантними антигенами *Mycoplasma hominis*.

**Позитивний контроль** – 1 мікропробірка, що містить 0,7 мл розчину імуноглобулінів людини, специфічних до *M.hominis* (рожевий).

**Негативний контроль** – 1 мікропробірка, що містить 1,8 мл негативної сироватки крові людини (жовтий).

**Розчин для розведення сироваток PPC** – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину з екстрактом молока, детергентом та консервантами (фіолетовий).

**Розчин кон'югату РК** – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину моноклональних антитіл до IgA людини, кон'югованих з пероксидазою хрому, із стабілізаторами та консервантом (помаранчевий). Готовий до використання.

**Розчин ТМБ** – 1 флакон, що містить 12 мл розчину ТМБ і перекису водню з стабілізатором та консервантом (безбарвний).

**Розчин для промивання Tr100 (20x)** – 1 флакон, що містить 50 мл 20-ти кратного концентрату фосфатного буферу з Тритоном X100 (безбарвний).

**Стоп-реагент** – 1 флакон, що містить 12 мл розчину 0,5 М сірчаної кислоти (безбарвний).

**Клейка плівка** – 2 аркуші плівки для заклеювання планшетів під час інкубації.

**Бланк внесення проб** – 1 аркуш для запису схеми внесення зразків.

**Інструкція** – 1 екземпляр інструкції з використання

#### 4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

Для постановки аналізу необхідні такі додаткові реактиви, матеріали та обладнання:

- деіонізована або дистильована вода;
  - фільтрувальний папір;
  - мірні циліндри на 10, 200 та 1000 мл;
  - одноразові рукавички;
  - розчин перекису водню 6%;
  - одноразовий або чистий посуд для приготування реактивів (флакони та ванночки);
  - таймер;
  - одно- та багатоканальні автоматичні піпетки змінного об'єму на 20, 200 та 1000 мкл та наконечники до них;
  - термостат на 37°C;
  - контейнер для твердих відходів;
  - контейнер для рідких відходів;
  - <sup>1</sup>автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
  - <sup>2</sup>одно- або багатоканальний спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 нм.
- <sup>1,2</sup> *Будь ласка, проконсультуйтеся з нами щодо адаптації Вашого обладнання.*

## 5. Застереження та техніка безпеки

### 5.1. Застереження:

– не використовуйте компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;  
– не використовуйте під час аналізу та не змішуйте компоненти різних серій та компоненти із тест-систем різних нозологій;

– не використовуйте реактиви інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest™;

*Примітка: Розчин для промивання Tr100 (20x), Розчин ТМБ та Стоп-реагент допускається використовувати інших серій, які відрізняються від тих, що вкладені до тест-набору. Ці реактиви використовуються в інших тест-системах виробництва ТОВ „ІВК „Рамінтек”. Будь ласка, проконсультуйтеся з нами для отримання детальної інформації.*

- після використання реагенту закривайте кожен флакон своєю кришкою;
- чітко дотримуйтесь режиму промивання планшетів, вказаного в пунктах інструкції;
- під час промивання контролюйте наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;
- кожного разу використовуйте новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;
- уникайте потрапляння прямих сонячних променів на реактиви тест-системи;
- розчин ТМБ має бути безбарвним або світло блакитним перед використанням, якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникайте контакту розчину ТМБ з металами або іонами металів. Для роботи використовуйте лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;
- для внесення в лунки планшета ТМБ-субстрату використовуйте лише нові наконечники, що не були у використанні;
- ні в якому разі не використовуйте один й той же посуд для розчину кон'югату та хромогену.

### 5.2. Техніка безпеки:

- всі реактиви набору призначені лише для in vitro діагностики;
- постановку аналізу проводити лише у гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- контролю тест-системи «Vitrotest Mycoplasma hominis-IgA» протестовано та знайдено негативними на HBsAg та антибіла до ВІЛ ½, ВГС, *Treponema pallidum*, однак працювати із контролями та досліджуваними сироватками слід як із потенційно небезпечним інфекційним матеріалом;
- рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6% упродовж 3 годин при кімнатній температурі, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5% протягом 30 хвилин, або іншими дезінфікуючими агентами;
- тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування при 121°C упродовж 1 години;
- не автоклауйте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;
- слід уникати розбрикування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту із слизовими оболонками та шкірою;
- у разі розбрикування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню 6 %-м перекисом водню, а потім витерти насухо фільтрувальним папером.

## 6. Зберігання та стабільність

Реактиви тест-системи стабільні протягом строку придатності вказаного на етикетці, якщо їх зберігати при 2-8°C.

Транспортувати набір при температурі 2-8°C. Допускається одноразове транспортування при температурі не вище 20°C протягом двох діб.

## 7. Підготовка зразків

Зразки сироватки чи плазми крові можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 3 діб після забору. Допускається більш тривале зберігання зразків замороженими при температурі від -20 до -70°C. Заморожені зразки перед використанням розморожують та витримують при кімнатній температурі упродовж 30 хвилин. Після розморожування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникайте повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільняються від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./хв. протягом 10-15 хвилин. Не використовуйте зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

## 8. Підготовка реагентів

*Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest Mycoplasma hominis-IgA» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.*

### 8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та **зберігайте щільно закритим на замок (zip-lock)** при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

### 8.2. Розчин для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

## 9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.2.

9.4. В лунки стрипів внести по 80 мкл розчину для розведення сироваток.

9.5. Внести в лунки по 40 мкл контролів та досліджуваних зразків: в лунку А1 – позитивний контроль, в лунки В1, С1 та D1 – негативний контроль. В решту лунок – досліджувані зразки. Під час внесення сироваток та контролів обережно піпетуйте суміш – відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з фіолетового на синій.

9.6. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.7. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.8. В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.9. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті 9.7.

9.10. «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником: обережно відібрати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 мкл розчину ТМБ в лунки.

9.11. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25°C.

9.12. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

9.13. Виміряти на рідері оптичну густину в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

*Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).*

## 10. Облік результатів та їх інтерпретація

### 10.1. Достовірність результатів аналізу:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$ОГ K_{-середнє} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3})/3.$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

– оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 1,5 оптичних одиниць (ОО),

– ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,15 ОО.

– оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$ОГ K_{-середнє} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{-середнє} \times 2,0.$$

Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення K- за рештою значень негативного контролю.

### 10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,25, тобто

$$Граничне значення = ОГ K_{-середнє} + 0,25.$$

Для кожного досліджуваного зразка розрахувати індекс позитивності (ІП)

$$ІП = \frac{ОГ досліджуваного зразка}{Граничне значення}.$$

### 10.3. Інтерпретація результатів

Досліджувані зразки із значенням ІП **вище 1,1** вважати **позитивними** (ІП > 1,1).

Зразки із значенням ІП **нижче 0,9** вважати **негативними** (ІП < 0,9).

Зразки із значенням ІП **в межах 0,9-1,1** вважати **невизначеними** ( $0,9 \leq ІП \leq 1,1$ ). Такі сироватки рекомендується дослідити повторно в двох лунках тест-системи. Якщо результати знову будуть в межах невизначених слід провести тестування сироватки, отриманої через 2-4 тижні. В разі одержання невизначених результатів вважати, що сироватка не містить специфічних до *M.hominis* антитіл класу IgA.

Використання індексу позитивності дозволяє проводити напівкількісний порівняльний аналіз рівня специфічних антитіл в парних сироватках крові. ІП в межах 1,1 – 7,0 пропорційний вмісту специфічних антитіл класу IgA. Це дозволяє проводити порівняльне дослідження парних сироваток, отриманих від пацієнтів з інтервалом у 2-4 тижні. Якщо ІП зразка становить вище 7,0 для коректної оцінки вмісту специфічних антитіл, рекомендується провести повторний аналіз зразка попередньо розведеного у 10 разів розчином для розведення сироваток. При визначенні індексу позитивності в такому разі слід перемножити отримане значення ІП на 10. Такий спосіб інтерпретації результатів аналізу дозволяє визначити рівень специфічних антитіл до *M.hominis* в динаміці.

## 11. Діагностичні характеристики тесту

### 11.1. Специфічність та чутливість

Чутливість тест-системи «Vitrotest Mycoplasma hominis-IgA» оцінювали за допомогою панелі охарактеризованих сироваток, що складається з 12 зразків сироваток крові людини, що містять антитіла класу IgA до *Mycoplasma hominis*. В тест-системі «Vitrotest Mycoplasma hominis-IgA» всі сироватки були визначені позитивними. При дослідженні 128 негативних на антитіла до *M.hominis* сироваток показник специфічності становив більше 97%.

### 11.2. Точність

*Відтворюваність результатів в межах однієї постановки аналізу (Intra assay reproducibility)*

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали в 32 повторях на двох серіях тест-систем.

№ сироватки	ІП	CV <sub>1</sub> , %	CV <sub>2</sub> , %
369	3,9	2,1	2,8
325	9,0	4,3	3,1

*Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)*

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали протягом трьох днів в трьох постановках аналізу по 8 повторів в кожному аналізі.

№ сироватки	ІП	CV, %
369	3,5	4,1
325	9,3	4,5

## 12. Обмеження аналізу

Визначення специфічних до *Mycoplasma hominis* антитіл у імуноферментному аналізі є особливо інформативним при тривалій та висхідній інфекції.

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest Mycoplasma hominis-IgA» є свідченням наявності у пацієнта антитіл класу IgA, специфічних до *M. hominis*, які продукуються організмом при інфікуванні цим збудником.

Відсутність антитіл класу IgA, специфічних до *M. hominis*, не виключає наявності інфекції, спричиненої *M. hominis*.

Для постановки діагнозу слід враховувати як результати комплексних лабораторних досліджень (серологічні та прямі методи діагностики), так і клінічні прояви захворювання.

## Література

1. Микоплазми // Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Позеев – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – С. 517-528.

2. Тейлор-Робинсон Л., Рентон А. Какие тесты для диагностики инфекции, передаваемых половым путем, следует использовать в индустриально развитых странах // Заболевания, передаваемые половым путем. – 1998. - №5. – С. 23-26.

3. Дяченко В.Ф., Бірюкова С.В., Старобінець З.Г. Лабораторна діагностика гнійно-запальних захворювань, обумовлених аспорогенними мікроорганізмами: Методичні рекомендації. – Харків, 2000. – 35 с.

4. Уніфікація лабораторних методів дослідження в діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом / Укладачі І.І.Мавров, О.П.Бєлозеров, Л.С. Тацька. – Харків: Факт, 2000. – 120 с.

## Умовні позначення

Інтерпретація умовних символів:

	«Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i> »
	«Код партії»
	«Номер за каталогом»
	«Дата виготовлення»
	«Використати до»
	«Температурне обмеження»
	«Містить достатньо для (n-) випробувань»
	«Берегти від прямих сонячних променів»
	«Увага, дивись інструкцію з використання»
	«Виробник»
	«Ознайомлення з інструкціями для застосування»

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



Товариство з обмеженою відповідальністю «Іноваційно-виробнича компанія «Рамінтек»  
03039 Україна, м. Київ, пр-т 40-річчя Жовтня, 7, оф. 227 (юридична адреса)  
07300 м. Вишгород, Київська обл., вул. Шолуденка, 19 (фактична адреса)  
тел. +380 44 222-76-72

## Схема проведення аналізу в тест-системі «Vitrotest Mycoplasma hominis-IgA»

Витримати реагенти 30 хв. при 18-25°C

Приготувати розчин для промивання планшета, розвести 20х концентрат розчину для промивання Tr100 очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води

Заповнити бланк внесення проб для аналізу

В лунки планшета внести по 80 мкл розчину для розведення сироваток

Внести по 40 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки:

A1 – позитивний контроль,

B1, C1, D1 – негативний контроль,

E1 та решта лунок – досліджувані зразки

Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з фіолетового на синій

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату (помаранчевий)

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату

Інкубувати планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі (18-25°C)

В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту

Виміряти оптичну густина в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм

Розрахувати граничне значення (ГЗ) в тест-системі «Vitrotest Mycoplasma hominis-IgA» за формулою:

$$ГЗ = ОГ К\text{-середнє} + 0,25$$

Розрахувати індекс позитивності (ІП) для досліджуваних зразків:  $ІП = \frac{ОГ \text{ досліджуваного зразка}}{\text{граничне значення}}$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці:

Значення ІП	Результат
$ІП_{\text{зразка}} > 1,1$	позитивний
$0,9 \leq ІП_{\text{зразка}} \leq 1,1$	невизначений
$ІП_{\text{зразка}} < 0,9$	негативний