

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Био-Рад Лаборатории»

Бобровник Е.В.



« » 2010 г.

**Инструкция по применению
изделия медицинского назначения**

**«Реагенты для диагностики методом
иммунофлуоресценции».**

2010

**СИСТЕМА ПРЯМОЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНА
CHLAMYDIA TRACHOMATIS**

Кат. №

30702, 30704

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Система **Pathfinder** основана на методе прямой иммунофлуоресценции и предназначена для идентификации *Chlamydia trachomatis* непосредственно в уретральных и ректальных мазках, а также в мазках, полученных из носоглотки и с конъюнктивы глаз.

КРАТКАЯ ИНФОРМАЦИЯ И РАЗЪЯСНЕНИЯ

В настоящее время установлено, что *Chlamydia trachomatis* является одним из основных возбудителей заболеваний, передающихся половым путем. Главные клинические проявления этой инфекции включают: у женщин - - цервицит, а у мужчин - уретрит и эпидидимит. К сожалению, во многих случаях заболевание протекает бессимптомно, не диагностируется, и поэтому больной не получает соответствующего лечения. У женщин перманентно протекающая инфекция вызывает нарушения репродуктивной функции, что связано с воспалительным процессом в области малого таза и сальпингитом. *Chlamydia trachomatis* может также поражать слизистую прямой кишки. Среди младенцев, родившихся от матерей с хламидийным цервицитом, отмечается высокая частота инфицирования, что чаще проявляется в виде специфического конъюнктивита и пневмонии. Специфический хламидийный конъюнктивит был описан также и у взрослых. Ранняя диагностика и своевременное лечение хламидиоза снижают риск развития осложнений и предотвращают дальнейшее распространение болезни.

В ранних методах выделение хламидий производили в желточных мешках куриных или мышинных эмбрионов. После усовершенствования культуральных методов они заменили эту более трудоемкую и примитивную технологию. Но даже сегодня усовершенствованные культуральные методы сохраняют присущие им неудобства. Кроме того, что эти методы более дорогостоящие и требуют сложной техники, они занимают до 6 дней. По этим причинам использование культуры клеток для выделения хламидий ограничено возможностями лабораторий.

Прямое исследование эпителиальных клеток из очага инфекции представляет собой разумную альтернативу культуральному методу. Вплоть до сегодняшнего дня окраска по Романовскому-Гимзе была одной из основных, давая, однако, результаты далекие от идеальных. Внедрение иммунофлуоресцентных и моноклональных технологий значительно улучшило качество методов

прямого исследования инфицированного материала.

В системе Pathfinder для обнаружения хламидийных элементарных телец непосредственно в клинических образцах используются моноклональные антитела меченые флуоресцеином. Этот метод совмещает в себе специфичность и воспроизводимость моноклональной технологии с быстротой и простотой прямого флуоресцентного теста. Формулировка предварительного заключения возможна уже через 30 минут после получения материала. Этот тест является простой и надежной альтернативой требующему времени культуральному методу.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Для идентификации *Chlamydia trachomatis* используются моноклональные антитела, меченные флуоресцеином. Вид *Chlamydia trachomatis* делится на 15 серотипов, обозначаемых: A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2 и L3. Антитела соединяются с главным наружным белком мембраны элементарных ретикулярных телец, что обеспечивает выявление всех 15 серотипов *Chlamydia trachomatis*. После нанесения на слайд с образцом, моноклональные антитела реагируют с антигенами хламидий, если последние присутствуют в образце. Во время процедуры промывки удаляются несвязавшиеся антитела. При исследовании с помощью флуоресцентного микроскопа в образцах, содержащих *Chlamydia trachomatis*, выявляется специфическая зеленая флуоресценция элементарных телец.

СОСТАВ НАБОРА

ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗОВ IN VITRO

Антитела и контрольные слайды хранить при температуре +2-8° C

Моноклональные антитела к *Chlamydia trachomatis*

Каждый флакон содержит 2,5 мл меченых флуоресцеином моноклональных антител к *Chlamydia trachomatis* с голубой краской Эванса, 0,1% азидом натрия, белковым стабилизатором и ингибитором неспецифического окрашивания. Раствор меченых антител готов к использованию, дополнительное его разведение снижает чувствительность проводимого теста. Признаками разрушения раствора являются: интенсивное зеленое окрашивание контрольных слайдов, а также изменение ожидаемой реактивности положительного и отрицательного контролей.

2. Контрольные слайды

Каждый слайд имеет 2 лунки: первая содержит неинфицированные клетки Маккоя и инактивированные элементарные тельца хламидий, вторая содержит только неинфицированные клетки Маккоя. Перед проведением каждой постановки теста достаньте один контрольный слайд из холодильника и доведите его до комнатной температуры, не вынимая из герметичной упаковки. Признаком возможного

повреждения является изменение ожидаемой реактивности с хламидийными антителами.

Предостережение: избегайте давления на поверхность упаковки.

3. Иммерсионная среда для анализа результатов

Каждый флакон содержит 2,75 мл раствора глицерола с Трис-буфером, отбеливающим реагентом и консервантами. Признаками возможного разрушения этого раствора является неадекватный результат взаимодействия с положительным или отрицательным контролями или интенсивное зеленое окрашивание контрольных слайдов. Иммерсионная среда специально разработана для системы Pathfinder. И для получения оптимальных результатов эта среда должна всегда использоваться при проведении анализов с помощью этой системы.

Замечание: Для получения правильных результатов не производите замену компонентов набора реагентами из других аналогичных наборов для РИФ, а также не используйте просроченные реактивы.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Реагенты, содержащие азид натрия.

Раствор антител и иммерсионная среда содержат 0,1% азид натрия. Это вещество, взаимодействуя со свинцом или медью, образует взрывоопасные соединения -азиды. В случае проливания этих растворов обильно промойте поверхность большим количеством воды для предотвращения образования азидов. Для получения дополнительной информации по этому вопросу см. Manual Guidege выпускаемый Center for Disease Control.

Контрольные слайды

Продемонстрировано, что хламидии, нанесенные на контрольные слайды, не обладают инфекционностью в клеточной культуре. Однако, использовать и хранить эти слайды следует как потенциально инфекционный материал.

Образцы

При заборе и исследовании образцов, полученных от пациентов, следуйте мерам предосторожности, применяемым при работе с инфекционным материалом.

ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Правильный забор материала является критическим моментом при проведении тестов на выявление *Chlamydia trachomatis*. Персонал, выполняющий эту процедуру должен быть обучен, что снижает число некорректно взятых проб.

Замечание: Следуйте обычным правилам безопасности при получении и исследовании образцов. Рассматривайте все образцы и контактирующие с ними материалы как потенциально инфицированные, и обращайтесь с ними соответствующим образом. Избегать попадания в ротовую полость и

разбрызгивания этих материалов.

Забор образцов.

Материалы, необходимые для проведения теста, но не поставляемые с набором.

1. Тампоны для удаления избытка слизи и эксудата.

2. Для получения уретральных, цервикальных, конъюнктивальных, назофарингеальных и ректальных мазков необходимо:

• Наборы для забора образцов (см. каталог Санофи Диагностикс Пастер), содержащие стерильные приспособления: 1 большой дакроновый тампон на пластиковом стержне, 1 малый дакроновый тампон на стальном стержне, 1 нейлоновая цитологическая щеточка (для цервикальных мазков только небеременных женщин), стеклянный слайд и фиксатор (метанол) для непосредственного приготовления образца.

ИЛИ

• Следующие эквивалентные материалы:

- Стерильные приспособления для забора

1. Малый дакроновый тампон на стальном стержне.

2. Большой дакроновый тампон на пластиковом стержне.

3. Нейлоновая цитологическая щеточка (для цервикальных мазков только небеременных женщин).

Замечание: Тампоны с альгинатом кальция не могут использоваться для забора материала при проведении данного исследования.

- Стеклянные слайды для микроскопирования. С помощью гравировочного карандаша добавить лунку диаметром 7 - 10 мм.

- Безацетонный метанол ACS. Хранить в стеклянном контейнере.

- Контейнер для транспортировки образцов в лабораторию.

- Стандартная коробка для хранения слайдов.

3. Для забора назофарингеального аспирата:

- Тонкие катетеры.

- Дренажная трубка, соединенная с аппаратом для аспирации.

- Контейнер для образцов.

- Стерильный фосфатный буфер (PBS).

- Слайды для образцов.

- Метанол ACS.

- Контейнер для транспортировки образцов в лабораторию.

- Стандартная коробка для хранения слайдов.

Процедура забора материала для исследования

Замечание: Хламидии поражают преимущественно клетки цилиндрического эпителия. Для диагностических целей образец должен содержать эпителиальные клетки из очага инфекции. Экссудат является неудовлетворительным материалом для проведения лабораторной диагностики.

1. Образцы из уретры.

В связи с тем, что пассаж мочи способствует удалению поверхностных клеток эпителия уретры, необходимо попросить пациента не мочиться в течение одного часа до забора материала.

а. Введите малый тампон на 2 - 4 см в уретру (слегка вращая его).

б. Аккуратно вращайте тампон, прикладывая при этом достаточное давление для получения образца эпителиальных клеток.

в. Оставьте тампон в уретре на 1 - 2 сек.

Удалите тампон и немедленно приготовьте слайд как описано в разделе "Приготовление Слайда для исследования» (см. ниже).

2. Образцы из цервикального канала.

Цилиндрические эпителиальные клетки слизистой цервикального канала локализуются сразу после зева шейки матки. В некоторых случаях расположение переходной зоны, где многослойный эпителий сменяется цилиндрическим, может быть иным. Выполняя следующие процедуры Вы можете быть уверены в получении образца клеток цилиндрического эпителия.

а: Используя стерильный тампон, удалите избыток слизи и экссудата с поверхности шейки матки. Сбросьте этот тампон в контейнер для контаминированных отходов.

б. Введите приспособление для забора материала в цервикальный канал. В случае использования большого тампона, введите его на 1 - 1,5 см вглубь канала. В течение 5 - 10 сек аккуратно вращайте его, прикладывая при этом достаточное давление для получения образца эпителиальных клеток.

При использовании цитологической щеточки, введите ее немногим более чем на половину длины гребешка. Совершите один медленный поворот щеточки вокруг ее оси.

в. Удалите приспособление для забора материала, избегая его контакта с вагинальными стенками и немедленно приготовьте слайд как описано в разделе "Приготовление Слайда для исследования» (см. ниже).

3. Конъюнктивальный материал.

При поражении обоих глаз получите материал отдельно из каждого глаза и исследуйте полученные образцы отдельно.

а. Оттяните нижнее веко вниз и обнажите конъюнктиву.

б. Тщательно удалите экссудат или гной с помощью стерильного влажного тампона.

Сбросьте этот тампон в контейнер для контаминированных отходов.

в. Стерильным, смоченным физиологическим раствором тампоном аккуратно, но тщательно проведите по конъюнктивальной поверхности нижнего века. Следите за тем, чтобы не повредить глазное яблоко.

г. Немедленно приготовьте слайд как описано в разделе "Приготовление Слайда для исследования» (см. ниже).

4. Ректальный материал.

а. Введите большой тампон на 3 - 5 см за анальный сфинктер.

б. Аккуратно вращайте тампон, одновременно перемещая его из стороны в сторону, для получения образца эпителиальных клеток слизистой прямой кишки. Удалите тампон и, в случае его загрязнения фекалиями, уничтожьте, а процедуру повторите.

в. Немедленно приготовьте слайд как описано в разделе "Приготовление Слайда для исследования» (см. ниже).

5. Назофарингеальный материал.

У пациентов с подозрением на хламидийную пневмонию получите аспират, смыв со слизистой или мазок из носоглотки.

а. Назофарингеальный аспират, смыв со слизистой носа.

- Получите назофарингеальный аспират путем введения тонкого катетера в носовой ход и аспирации. Осторожно извлеките катетер. Если образца недостаточно, можно получить смыв со слизистой путем введения в каждый носовой ход нескольких мл стерильного PBS. Поместите емкость для сбора образца ниже носа пациента, наклоните его голову и позвольте жидкости стечь в контейнер. Для маленьких детей достаточно катетера и мягкой аспирации.

- Поместите образец на лед, и немедленно доставьте в лабораторию.

- Доведите общий объем образца до 2-3 мл фосфатным буфером.

- Приготовьте слайд как описано в разделе "Приготовление Слайда для исследования» (см. ниже). Если слайд не может быть приготовлен немедленно, храните образец при +2-8°C 24 часа. Для более длительного хранения образец необходимо заморозить при -70°C.

б. Назофарингеальный мазок.

- Получите мазок путем введения малого тампона в заднюю часть носового хода.

- Вращайте тампон для получения образца клеток.

- Оставьте тампон в носовом ходу на 1 - 2 сек, затем удалите его.

- Немедленно приготовьте слайд как описано в разделе "Приготовление Слайда для исследования» (см. ниже).

Приготовление слайда для исследования.

1. Уретральные, цервикальные, конъюнктивальные и ректальные мазки и материал, полученный с помощью цервикальных щеточек.

а. На слайде напишите карандашом инициалы пациента.

- б. Для переноса материала на слайд проведите тампоном или цитологической щеточкой по стекляннй поверхности слайда, оставаясь в пределах лунки.
 - в. Исследуйте слайд под микроскопом и, в случае малого количества перенесенных клеток эпителия, повторите этап б.
 - г. Дайте слайду хорошо просохнуть на воздухе (5 - 10 минут).
 - д. Нанесите на слайд 0,5 мл метанола и дайте ему высохнуть.
 - е. Отправьте слайд в лабораторию. Хранить слайд следует при комнатной температуре не более 7 дней.
2. Назофарингеальный аспират или смыв.
- а. На слайде напишите карандашом инициалы пациента.
- б. Гомогенизируйте полученный материал.
- в. Нанесите примерно 30 мкл материала в лунку слайда и дайте ему хорошо просохнуть.
 - г. Исследуйте слайд под микроскопом и, в случае малого количества перенесенных клеток эпителия, нанесите дополнительное количество материала в лунку слайда и дайте ему хорошо просохнуть.
 - д. Нанесите на слайд 0,5 мл метанола и дайте ему высохнуть.
 - е. Отправьте слайд в лабораторию. Хранить слайд следует при комнатной температуре не более 7 дней.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ.

Материалы, входящие в набор.

1. Моноклональные антитела к *Chlamydia trachomatis*.
2. Контрольные слайды.
3. Иммерсионная среда.

Материалы не входящие в набор, но необходимые для проведения исследования.

1. Дистиллированная или деионизированная вода

Бокс с высокой влажностью

3. Мензурка или бутылка для промывочной воды.

4. Покровные стекла

5. Флюоресцентный микроскоп

- Для исследования образцов, окрашенных изотиоцианатом флюоресцеина, необходимо использовать фильтры, обеспечивающие получение возбуждающего пучка с длиной волны 480 - 490 нм и регистрацию эмиссионных лучей с длиной волны 510 нм или более. Для получения оптимальных результатов рекомендуется использование ртутного источника света мощностью 50 Ватт и объективы с высоким разрешением. На интенсивность флюоресценции могут влиять такие параметры как тип, состояние и длительность использования фильтров, а также длительность работы источника света (кВт-час).

Процедура Флюоресцентного исследования.

1. Извлечь контрольные слайды из холодильника и довести их до комнатной температуры (5 - 10 мин), не вынимая из герметичной упаковки.
2. Извлечь исследуемые слайды из контейнера, а контрольные слайды из герметичной упаковки. Поместить их в бокс с высокой влажностью.
3. Добавить 1 каплю (приблизительно 30 мкл) моноклональных антител к *Chlamydia trachomatis* в каждую лунку исследуемых и контрольных слайдов. Раствор антител должен полностью покрывать лунку.
4. Инкубировать слайды в течение 15 минут во влажной среде бокса при комнатной температуре. Не допускать высыхания раствора антител на слайде.
5. Тщательно промыть слайды дистиллированной водой в течение 10 - 15 сек для удаления избытка реагента. Опустить слайд в мензурку или другую емкость с дистиллированной водой, или использовать омывающую бутылку и аккуратно промыть слайд, ориентируя струю дистиллированной воды несколько выше области лунки и добиваясь равномерного стекания воды по всей плоскости слайда. Не направлять струю воды непосредственно на лунку. Стряхнуть остатки воды с слайда.
6. Внести в лунку слайда 1 каплю иммерсионной среды и накрыть лунку покровным стеклом, следя за тем, чтобы не образовывались пузырьки.
7. Исследовать слайд в флюоресцентном микроскопе. Просмотреть всю лунку при увеличении $\times 400$ - 500 и подтвердить предварительное заключение при увеличении $\times 1000$. Слайды могут быть исследованы в течение 24 часов после обработки. При этом они должны храниться при температуре $+2 - 8^{\circ}\text{C}$.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для подтверждения качества проведенного теста и достоверности полученных результатов в каждую постановку включайте контрольные слайды. Если в контроле не удастся получить ожидаемой флюоресценции, то результаты теста являются сомнительными.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В начале исследуйте контрольные слайды. Если удастся получить ожидаемую флюоресценцию, то переходите к исследованию слайдов с мазками, полученными от пациентов. Повторите тест, если в контроле наблюдается недостаточная флюоресценция.

Положительные результаты теста

Результат считается положительным, если при увеличении $\times 400$ - 500 удастся зафиксировать флюоресценцию внеклеточных элементарных телец, видимых в виде светящихся точек. При

увеличении $\times 1000$ эти элементарные тельца выглядят как светящиеся зеленые округлые пятна с гладкими краями. Иногда удается зарегистрировать округлые образования большего размера, которые являются ретикулярными тельцами. Эти ретикулярные тельца также имеют характерное зеленое свечение, возникающее в виде периферического ореола. Неспецифическое окрашивание можно отличить от элементарных телец по нехарактерной для них форме и размеру, по неравномерному окрашиванию, желтому или белому цвету флюоресценции.

Положительный контроль

В лунке положительного контроля должно выявляться не менее 100 элементарных телец.

Положительный урогенитальный мазок

Урогенитальный мазок, в котором регистрируется 5 и более элементарных телец в лунке, рассматривается как положительный. Этот уровень (cut-off) рекомендуется для исключения ложноположительных результатов. Лаборатория при достаточном опыте работы может использовать и более низкий уровень для интерпретации мазка как положительного.

Положительные неурогенитальные мазки

Ректальные, конъюнктивальные или назофарингеальные мазки считаются положительными при выявлении хотя бы одного элементарного тельца в поле зрения. Такой низкий контрольный уровень (cut-off) обусловлен низким содержанием антигена в образцах такого типа.

Отрицательные результаты теста

Замечание: Отрицательным может считаться только мазок, в котором присутствуют клетки цилиндрического эпителия. При их отсутствии результат может формулироваться только как "Непозволяющий сделать определенного заключения".

Отрицательные мазки имеют только минимальную неспецифическую флюоресценцию. В связи с фоновым окрашиванием все клетки имеют красный цвет.

Отрицательный контроль

В негативном контроле не должно наблюдаться флюоресценции, характерной для хламидий.

Отрицательные образцы пациентов

Образцы считаются отрицательными если они не проявляют специфической флуоресценции или флуоресценция меньше, чем требуется для величины "cutoff" для данного типа образца.

ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

1. Если антитела высыхают на слайде в течении инкубации, визуализация элементарных телец может быть затруднена и результаты могут быть недействительны.
2. Проведение теста с образцами, собранными у пациента во время или после проведения антимикробной терапии, не является показательным.
3. Определение *Chlamydia trachomatis* в прямых клинических образцах зависит от правильности забора

образцов, приготовления слайдов и транспортировки. Персонал, собирающий образцы, должен быть хорошо обучен для предупреждения забора неадекватных и несоответствующих образцов.

4. Интерпретируйте тест в совокупности с клиническими признаками и другими лабораторными данными. Отрицательный результат не исключает вероятности хламидийной инфекции у пациента.

5. Данный тест может определять нежизнеспособные организмы хламидий в прямых клинических образцах.

6. Интерпретируйте результаты осторожно в популяциях с низкой распространенностью.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Ожидаемые результаты зависят от исследуемой популяции. С помощью тест-системы **Pathfinder** и хламидийной культуры были протестированы следующие образцы: 1101 урогенитальный образец из взрослых групп высокого и низкого риска, 119 ректальных и 132 конъюнктивальных мазка, полученных от взрослых пациентов, 188 назофарингеальных образца, полученных от детей. Результаты, полученные с помощью тест-системы **Pathfinder**, совпали с результатами на клеточной культуре в 96% случаев. Средние чувствительность и специфичность составили 86% и 99% соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

См. английскую версию.