

Копия верна



«УТВЕРЖДАЮ»



## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов  
класса G к белку теплового шока  
(HSP60) *Chlamydia trachomatis*  
«ХламиБест сHSP60 – IgG»

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к белку теплового шока (HSP60) *Chlamydia trachomatis* в сыворотке (плазме) крови человека и может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях.

Антитела к HSP60 *C. trachomatis* являются маркером хламидийной инфекции фаллопиевых труб и трубной окклюзии, и их наличие повышает вероятность неудачи экстрапорального оплодотворения.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 (12x8) анализов, включая контроли (по 3 лунки используют для постановки контролей).

### 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

#### 2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

Антиген HSP60 *C. trachomatis* иммобилизован в лунках полистироловых планшетов. При инкубации в лунках исследуемых образцов сывороток происходит специфическое связывание антител с антигеном. Несвязавшийся материал отмывают, добавляют в лунки конъюгат, после инкубации которого лунки промывают и вносят раствор ТМБ. В результате ферментативной реакции образуется окрашенный продукт, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации в лунках IgG к антигену HSP60 *C. trachomatis*.

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом ре-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и зав. лабораторией бактериальных инфекций С.А. Кротовым

10

жиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм. Интенсивность жёлтого окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце иммуноглобулинов класса G к HSP60 *C. trachomatis*.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения ОП<sub>крит</sub> анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицательные.

## 2.2. Состав набора

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

- планшет с иммобилизованным рекомбинантным антигеном HSP60 *C. trachomatis* – 1 шт.;
- K<sup>+</sup>, положительный контрольный образец, инактивированный – лиофилизированная сыворотка крови человека, содержащая иммуноглобулины класса G к антигену HSP60 *C. trachomatis* – аморфная масса белого или светло-желтого цвета, гигроскопична – 1 фл.;
- K<sup>-</sup>, отрицательный контрольный образец, инактивированный – лиофилизированная сыворотка крови человека, не содержащая иммуноглобулины класса G к антигену HSP60 *C. trachomatis* – аморфная масса белого или желтого цвета, гигроскопична – 1 фл.;
- конъюгат – антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена, лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета, гигроскопична – 1 фл.;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 3,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – прозрачная жидкость зелёного цвета – 1 фл., 13,0 мл;
- разводящий буфер для сывороток (РБС) – жидкость красного цвета – 1 фл., 13,0 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при нагревании – 1 фл., 28,0 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 13,0 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 1,5 мл;

– стоп-реагент – раствор серной кислоты, 1 моль/л – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 12,0 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 4-200 мкл – 16 шт.

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором IgG к HSP60 *C. trachomatis* должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия, включающей образцы сывороток, содержащие и не содержащие IgG к HSP60 *C. trachomatis* (рег. № 05-2-187 от 01.06.07). Чувствительность и специфичность по IgG к HSP60 *C. trachomatis* – 100%.

### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При подготовке к проведению анализа 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 % раствором перекиси водорода (не менее 6 ч).

### 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

термостат, поддерживающий температуру  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;

холодильник бытовой;

пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);

пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);

промывочное устройство для планшетов;

перчатки резиновые хирургические;

бумага фильтровальная лабораторная;

цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;

цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

вода очищенная;

6% раствор перекиси водорода.

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для внесения образцов в лунки стрипов следует использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°С не более 5 суток, либо при минус (20±3)°С, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифуговать 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25) °С.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Контрольные образцы, концентрированный раствор конъюгата должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами хранить при (2-8) °С, использовать в течение 1 мес.

Растворы ТМБ и конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Исключить воздействие света на раствор ТМБ.

При промывке лунки планшета заполнять полностью (300-400 мкл промывочного раствора в зависимости от типа планшета) и не касаться лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Перекисью водорода (другие дезинфицирующие растворы не использовать) обрабатывать только наконечники для пипеток, используемые для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами. В случае их повторного использования, обеззараживать в 6% перекиси водорода (не менее 6 ч) с последующей 10-кратной промывкой в проточной воде, 3-кратной промывкой в дистиллированной воде и кипячением (40 мин) в последней из 3-х порций дистиллированной воды, чтобы избавиться от следов перекиси.

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с остальными реагентами, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента. В случае повторного использования посуду (ванночки) наконечники для пипеток промыть проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с ТМБ, в случае повторного использования, сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

## 7.2. Приготовление реагентов.

Перед проведением анализа реагенты набора, в том числе пакет с планшетом, а также исследуемые образцы сыворотки (плазмы) выдержать при комнатной температуре (18-25 °С) не менее 30 мин.

### 7.2.1. Стрипы

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку планшета необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы поместить вновь в пакет с осушителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранение: при (2-8) °С до 1 мес.

### 7.2.2. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При наличии осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов в чистую емкость отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см. таблицу), развести дистиллированной водой до указанного в таблице объема и тщательно перемешать.

Хранение: при (2-8) °С до 72 ч.

#### 7.2.3. Контрольные образцы

Растворить лиофилизированные контрольные образцы добавлением во флакон с  $K^+$  – 0,3 мл РПР, а во флакон с  $K^-$  – 0,5 мл РПР. Тщательно перемешать.

Хранение: при (2-8) °С до 1 мес.

#### 7.2.4. Раствор конъюгата

*Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток.*

Приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – при (2-8) °С до 1 мес.

*Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!*

Тщательно взболтать содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (РК). Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество (см. таблицу) концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

#### 7.2.5. Раствор ТМБ в рабочем разведении

*Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, прилагаемой к набору, непосредственно перед использованием! Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином.*

В ванночку для реагентов отобрать необходимое количество концентрата ТМБ в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу), добавить соответствующее количество СБР, тщательно перемешать.

Хранение: Раствор стабилен до 3 ч в защищенном от света месте при (18-25) °С.

#### 7.3. Проведение анализа

Внимание! Промывочный раствор, контрольные образцы и концентрированный раствор конъюгата должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до постановки ИФА и выдержаны при температуре (18-25) °С.

7.3.1. Планшет промыть один раз промывочным раствором, заливая в каждую лунку по 300 мкл промывочного раствора. По истечении 5 мин раствор аккуратно удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Таблица расхода реагентов

|                                          | Количество используемых стрипов |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                    |                    |                    |
|------------------------------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                                          | 1                               | 2                 | 3                 | 4                 | 5                 | 6                 | 7                 | 8                 | 9                 | 10                 | 11                 | 12                 |
| Промывочный раствор                      |                                 |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                    |                    |                    |
| ФСБ-Т×25, мл                             | 2                               | 4                 | 6                 | 8                 | 10                | 12                | 14                | 16                | 18                | 20                 | 22                 | 24                 |
| Дистиллированная вода, мл                | до 50                           | до 100            | до 150            | до 200            | до 250            | до 300            | до 350            | до 400            | до 450            | до 500             | до 550             | до 600             |
| Раствор конъюгата в рабочем разведении   |                                 |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                    |                    |                    |
| Концентрированный раствор конъюгата, мкл | $\alpha^*$                      | $2 \times \alpha$ | $3 \times \alpha$ | $4 \times \alpha$ | $5 \times \alpha$ | $6 \times \alpha$ | $7 \times \alpha$ | $8 \times \alpha$ | $9 \times \alpha$ | $10 \times \alpha$ | $11 \times \alpha$ | $12 \times \alpha$ |
| РК, мл                                   | 1,0                             | 2,0               | 3,0               | 4,0               | 5,0               | 6,0               | 7,0               | 8,0               | 9,0               | 10,0               | 11,0               | 12,0               |
| Раствор ТМБ в рабочем разведении         |                                 |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                    |                    |                    |
| ТМБ, концентрат, мкл                     | 50                              | 100               | 150               | 200               | 250               | 300               | 350               | 400               | 450               | 500                | 550                | 600                |
| СБР, мл                                  | 1,0                             | 2,0               | 3,0               | 4,0               | 5,0               | 6,0               | 7,0               | 8,0               | 9,0               | 10,0               | 11,0               | 12,0               |

$\alpha^* =$  \_\_\_\_\_ мкл

7.3.2. Во все лунки планшета внести по 80 мкл разводящего буфера для сывороток. В любые две лунки внести по 20 мкл подготовленного (п. 7.2.3) контрольного отрицательного образца ( $K^-$ ), в одну лунку – 20 мкл подготовленного (п. 7.2.3) контрольного положительного образца ( $K^+$ ), во все остальные лунки внести по 20 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы), получая таким образом, разведение 1:5. Внесение образцов должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).

7.3.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при  $(37 \pm 1)$  °С.

7.3.4. За 5-10 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.4). По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть планшет 5 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

Внимание! Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (300-400 мкл рабочего промывочного раствора в зависимости от типа планшета). Необходи-

мо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

7.3.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

7.3.6. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором (6% раствор перекиси водорода) и промыть 5 раз промывочным раствором, удалить влагу как описано выше.

7.3.7. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении (п. 7.2.5).

Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ.

Внимание! Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, прилагаемые к набору.

Планшет поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре  $(18-25) ^\circ\text{C}$ .

7.3.8. Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин измерить оптическую плотность (ОП).

*Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.*

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

## 9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- среднее значение ОП в лунках с  $\text{K}^-$  не более 0,25,
- значение ОП в лунках с  $\text{K}^+$  не менее 0,6.

Критическое значение оптической плотности рассчитать по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}}(\text{K}^-) + 0,2.$$

Исследуемую сыворотку расценивать как положительную, если соответствующее ей значение  $\text{ОП}_{\text{обр}} \geq \text{ОП}_{\text{крит}} + 0,05$ .

Исследуемую сыворотку расценивать как отрицательную, если соответствующее ей значение  $ОП_{обр} \leq ОП_{крит} - 0,05$ .

Результат считается сомнительным, если  $ОП_{крит} - 0,05 < ОП < ОП_{крит} + 0,05$ .

## 10. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 9 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора обращаться:

в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу: 630559, п. Кольцово, Новосибирской обл, Новосибирского района, а/я 121, тел. (383) 336-92-49, 227-60-30, 227-67-64, тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44, 336-73-46.

E-mail: [vbobtk@vector-best.ru](mailto:vbobtk@vector-best.ru)

и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495) 120-60-95; 120-60-96.

Зав. лаб. бактериальных инфекций

ЗАО «Вектор-Бест»

С.А. Кротов

Проректор по НР и ПП

ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава

член-корреспондента РАМН, профессор



Л.М. Огородова

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов