

УТВЕРЖДЕНА

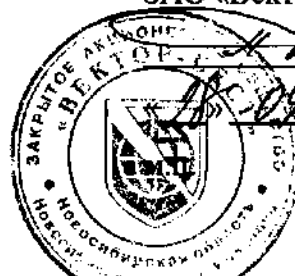
Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса G к главному белку наружной мембраны (МOMP) и
плазмидному белку Pgp3 *Chlamydia trachomatis*
«ХламиБест МOMP+Pgp3 – IgG»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к главному белку наружной мембраны (МOMP) и плазмидному белку Pgp3 *Chlamydia trachomatis* в сыворотке (плазме) крови человека и может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов. Возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли (по 3 лунки используют для постановки контролей).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантных антигенов. Антигены МOMP и Pgp3 *Chlamydia trachomatis* иммобилизованы в лунках полистироловых планшетов. Во время первой инкубации происходит связывание специфических IgG к МOMP и Pgp3 *Chlamydia trachomatis*, содержащихся в исследуемых образцах сывороток крови, с иммобилизованными на поверхности лунок стрипов антигенами *Chlamydia trachomatis*. На втором этапе антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена, связываются с комплексом «антиген-антитело».

Во время третьей инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы «антиген-антитело».

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

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 МOMP и Pgp3 *Chlamydia trachomatis*.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения ОП_{крил} анализируемые образцы оцениваются как положительные, сомнительные или отрицательные.

2.2. Состав набора:

- планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами МOMP и Pgp3 *Chlamydia trachomatis* – 1 шт.;

- положительный контрольный образец (K⁺), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий иммуноглобулины класса G к антигенам МOMP и Pgp3 *Chlamydia trachomatis* - прозрачная жидкость красного цвета – 1 флакон (0,5 мл);

- отрицательный контрольный образец (K⁻), инактивированный – на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий иммуноглобулины класса G к антигенам МOMP и Pgp3 *Chlamydia trachomatis* - прозрачная жидкость желтого цвета – 1 флакон (1,0 мл);

- конъюгат – антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена, лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета – 1 флакон;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином - прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при нагревании – 1 флакон (28,0 мл);

- раствор для предварительного разведения (РПР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (3,0 мл);

- раствор для разведения сывороток (РС) – прозрачная жидкость желто-красного цвета – 1 флакон (13,0 мл);

- раствор для разведения конъюгата (РК) – прозрачная жидкость зелёного цвета – 1 флакон (13,0 мл);

- раствор тетраметилбензидина – прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость – 1 флакон (13,0 мл);

или

- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (1,5 мл);

- и субстратный буферный раствор (СБР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (13,0 мл);

- стоп-реагент – 1 флакон (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. Чувствительность по IgG к МOMP и Pgp3 *Chlamydia trachomatis* по стандартной панели предприятия (СПП 05-2-108), должна составлять 100 %.

3.2. Специфичность по IgG к МOMP и Pgp3 *Chlamydia trachomatis* по стандартной панели предприятия (СПП 05-2-108), должна составлять 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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 дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113 от 29.10.98.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 650 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 $^\circ\text{C}$;
- 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;
- вода дистиллированная;

- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать в течение 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 от 18 до 25 °С.

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

Лиофилизированные компоненты должны быть восстановлены, как минимум, за 15 мин до его использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина.

При промывке лунки (стрипа, планшета) заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через край лунок, и не касаясь 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-

T×25, стоп-реагент, раствор тетраметилбензидина или концентрат ТМБ, СБР), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов..

Посуду (ванночки), используемые для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

В случае повторного использования посуды (ванночки) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки) для раствора ТМБ сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов (МУ-231-113 от 29.10.98).

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

7.2. Приготовление реагентов.

7.2.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-T×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогнать его до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-T×25 (см. таблицу) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

Хранение: до 72 ч при температуре от 2 до 8 °С.

7.2.2. Контрольные образцы

Контрольные образцы (K^+ и K^-) готовы к использованию.

Хранение: в течение всего срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

7.2.3. Растворы 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: до 1 месяца при температуре от 2 до 8 °С.

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 нипетированием.

7.2.4. Раствор ТМБ

Внимание! Раствор ТМБ 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. Приготовленный раствор стабилен до 3 ч в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С.

Если в состав набора входит раствор тетраметилбензидина, то дополнительное разведение не требуется. Раствор тетраметилбензидина готов к использованию. Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

В пластиковую ванночку отбирать только необходимое количество раствора ТМБ (в соответствии с числом используемых стрипов). Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать.

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	α^*	$2 \times \alpha$	$3 \times \alpha$	$4 \times \alpha$	$5 \times \alpha$	$6 \times \alpha$	$7 \times \alpha$	$8 \times \alpha$	$9 \times \alpha$	$10 \times \alpha$	$11 \times \alpha$	$12 \times \alpha$
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

$\alpha^* = \underline{\hspace{2cm}}$ мкл

7.3. Проведение анализа

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при температуре от 2 до 8 °С до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1), концентрированный раствор конъюгата (п. 7.2.3).

Внимание! Концентрированный раствор конъюгата должен быть приготовлен, как минимум за 15 минут до постановки ИФА и выдержан при температуре от 18 до 25 °С.

7.3.2. Перед началом анализа лунки стрипов промыть 1 раз приготовленным промывочным раствором (п. 7.2.1.). В каждую лунку внести по 400 мкл промывочного раствора. Через 5 мин после заполнения лунок промывочный раствор аккуратно удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

Не допускается высыхание лунок планшета между отдельными операциями при постановке реакции.

7.3.3. Во все лунки стрипов внести по 80 мкл раствора для разведения сывороток (РС). В любые две лунки внести по 20 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), в одну лунку – 20 мкл положительного контрольного образца (K^+), во все остальные лунки внести по 20 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы). Внесение образцов должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).

Лунки заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

За 5-10 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.3).

7.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки 5 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

Внимание! Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (400 мкл рабочего промывочного раствора). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

Внимание! Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые пипетки, входящие в состав набора.

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

По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть 5 раз промывочным раствором, удалить влагу как описано выше.

7.3.6. Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ (п. 7.2.4.).

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

Стрипы поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре от 18 до 25 °С.

7.3.7. 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

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом не более 0,25 ($ОП_{ср}(K^-) \leq 0,25$),
- значение ОП в лунках с положительным контрольным образцом не менее 0,60 ($ОП(K^+) \geq 0,60$).

Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,25.$$

где $ОП_{ср}(K^-)$ — среднее значение ОП для отрицательного контрольного образца.

Исследуемый образец оценить как:

- отрицательный, т.е. не содержащий IgG к MOMP и Pgp3 *Chlamydia trachomatis*, если полученное для него значение $ОП_{обр} \leq ОП_{крит} - 0,05$;
- положительный, т.е. содержащий IgG к MOMP и Pgp3 *Chlamydia trachomatis*, если значение $ОП_{обр} \geq ОП_{крит} + 0,05$;
- сомнительный, если $ОП_{крит} - 0,05 < ОП_{обр} < ОП_{крит} + 0,05$.

9.2. Интерпретация результатов:

Оптическая плотность исследуемых образцов	Результат	Титр IgG
от 0 до ($ОП_{крит} - 0,05$)	отрицательный	–
от ($ОП_{крит} - 0,05$) до ($ОП_{крит} + 0,05$)	сомнительный	–
от ($ОП_{крит} + 0,05$) до $2 \times ОП_{крит}$	слабоположительный	1:5
от $2 \times ОП_{крит}$ до $4 \times ОП_{крит}$	положительный	1:10
от $4 \times ОП_{крит}$ до $6 \times ОП_{крит}$	сильноположительный	1:20
от $6 \times ОП_{крит}$ до $8 \times ОП_{крит}$	сильноположительный	1:40
от $8 \times ОП_{крит}$ до $10 \times ОП_{крит}$	сильноположительный	1:80
более $10 \times ОП_{крит}$	сильноположительный	1:160

Рекомендуем повторное исследование сомнительных сывороток.

Для мониторинга иммунного профиля пациента сравнивают образцы сыворотки в острой и конвалесцентной стадиях заболевания.

Простой серологический тест не может быть использован для постановки диагноза. Все клинические и лабораторные данные должны быть рассмотрены в совокупности.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

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 – 12 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

и в Лабораторный центр ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (499) 120-60-95; 120-60-96.

**Зав. лаборатории
бактериальных инфекций
ЗАО «Вектор-Бест»**

С.А. Кротов

**Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»**

В.К. Ткачев В.К. Ткачев

Проректор по НР и ПП
ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава
член-корреспондента РАМН, профессор



Л.М. Огородова



Пронумеровано,
применено
и скреплено печатью
девятнадцать листов

[Signature]