

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

от _____ 20 ____ г

№ _____



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ
ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ КЛАССА М к Chlamydia trachomatis
«Хламидиоз-IgM-трахоматис»

1. Назначение

1.1 Выявление видоспецифических антител класса М к Chlamydia trachomatis в сыворотке (плазме) крови человека, может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях, а также службой крови для выявления носителей Chlamydia trachomatis (с подтверждением другими методами).

1.2 Набор рассчитан на проведение анализа 90 неизвестных, 1 контрольного положительного образца в двух повторях, 1 контрольного отрицательного образца в трех повторях, 1 контроля конъюгата (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия

Принцип действия набора реагентов основан на непрямом иммуноферментном анализе. На первой стадии анализа исследуемые образцы инкубируют в лунках планшета с иммобилизованным антигеном Chlamydia trachomatis. Если в сыворотке (плазме) содержатся антитела к Chlamydia trachomatis, образуется комплекс антиген-антитело. После промывки планшета в лунки планшета вносят антивидовой конъюгат (антитела к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена), который связывается с антителами класса М к Chlamydia trachomatis, если они присутствуют в образце. Визуализация образовавшегося комплекса «антиген-антитело-конъюгат» происходит за счет ферментативной реакции пероксидазы с субстратной смесью и образования окрашенного продукта. После остановки ферментативной реакции раствором серной кислоты (стоп-реагент) результаты анализа учитывают фотометрически. Величина оптической плотности (ОП) окрашенной хромогенной смеси пропорциональна концентрации специфических антител в образце сыворотки или плазмы.

2.2. Состав набора

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок рекомбинантным антигеном Chlamydia trachomatis (иммуносорбент) - 1 шт.;
- контрольный положительный образец на основе сыворотки крови человека, содержащий IgM к Chlamydia trachomatis (K+) - прозрачная синего цвета жидкость - 1 флакон (1,3 мл);
- контрольный отрицательный образец на основе сыворотки крови человека, не содержащий IgM к Chlamydia trachomatis (K-) - прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость - 1 флакон (1,5 мл);

- конъюгат (Кг) - моноклональные мышинные антитела к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, прозрачная зеленого цвета жидкость - 1 флакон (0,5 мл);
- буферный раствор для разведения сывороток (РБР-С) - прозрачная фиолетового цвета жидкость - 1 флакон (11 мл);
- буферный раствор для разведения конъюгата (РБР-К) - прозрачная зеленого цвета жидкость - 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т(концентрат x25)) - прозрачная, слегка опалесцирующая, бесцветная жидкость. Допускается выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при нагревании при температуре 37 °С в течение 30 мин - 1 флакон (26,0 мл);
- буферный раствор для субстрата (БРС) - прозрачная бесцветная жидкость - 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), хромоген - прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость - 1 флакон (0,7 мл);
- стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость - 1 флакон (6,0 мл);
- пленка для заклеивания планшета - 2 шт.;
- ванночка для реагентов - 2 шт.;
- наконечники для пипетки на 4-200 мкл - 16 шт..

3. Аналитические и диагностические характеристики

Набор реагентов «Хламидиоз-IgM-трахоматис» предназначен для выявления антител класса М к *Chlamydia trachomatis* в сыворотке (плазме) крови человека.

Специфичность выявления иммуноглобулинов класса М *Chlamydia trachomatis* по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса М *Chlamydia trachomatis* по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

4. Меры предосторожности

4.1. Потенциальный риск применения набора - класс 2б.

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как в состав набора входят компоненты крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. Оборудование и материалы

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм;

- прибор, позволяющий производить инкубирование при температуре 37 ± 1 °C (термостат);
- промывочное устройство для планшетов;
- 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 3 %);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная.

6. Анализируемые образцы

Для проведения анализа используют образцы сыворотки или плазмы крови человека объемом не менее 40 мкл. Желательно использовать свежеприготовленные образцы сыворотки (плазмы) крови, допускается использование образцов, хранившихся при температуре 2 - 8 °C не более 7 сут, либо при минус 20 °C не более 3 мес.

Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность контаминации посторонней микрофлорой.

При необходимости осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования в течение 10-15 мин при 3000 об/мин.

Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией, не использовать термоинактивированные сыворотки и сыворотки с добавлением азида натрия. Избегать повторных циклов замораживания и оттаивания образцов. Для возможного повторного исследования образца сыворотки желательно образец разделить на аликвоты, которые хранить при температуре 2 - 8 °C не более 7 сут, либо при минус 20 °C не более 3 мес.

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.

7. Проведение анализа

Внимание! При проведении анализа нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов.

Окисляющие агенты, ионы металлов, моющие средства на посуде могут разлагать ТМБ. Во избежание ложных результатов необходимо тщательно отмывать посуду раствором кислоты серной или соляной 1 моль/л с последующей отмывкой дистиллированной водой.

Перед постановкой реакции все компоненты тест-системы необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °C.

7.1 Приготовление реагентов, растворов, исследуемых образцов сывороток

7.1.1 Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т

При наличии во флаконе с ФСБ-Т(концентрат x25) визуально определяемого осадка солей флакон с концентратом выдержать при температуре 37 °C до полного растворения солей.

Содержимое флакона с ФСБ-Т(концентрат x25) перенести в мерный цилиндр вместимостью 1 л и довести объем раствора до 650 мл дистиллированной водой.

В случае использования одного или нескольких стрипов разборного планшета в мерный цилиндр внести концентрат ФСБ-Т из флакона и добавить дистиллированную воду в соответствии с таблицей.

Хранение: неиспользованный ФСБ-Т (концентрат x25) хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора, рабочий раствор ФСБ-Т - при температуре от 2 до 8 °С в течение двух недель.

Расход реагентов набора «Хламидиоз-IgM-трахоматис»

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т												
ФСБ-Т (концентрат x25), мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26
Вода дистиллированная, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 650
Приготовление рабочего раствора конъюгата												
РБР-К, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
Конъюгат, мл	x*	2x	3x	4x	5x	6x	7x	8x	9x	10x	11x	13x
Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина												
БРС, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
ТМБ, мл	0,050	0,100	0,150	0,200	0,250	0,300	0,350	0,400	0,450	0,500	0,550	0,650

* x - объем конъюгата - подбирается для каждой серии на производстве тест-систем при изготовлении наборов

7.1.2 Приготовление РБР-С, РБР-К и БРС

РБР-С, РБР-К и БРС – готовы к использованию.

Хранение: после вскрытия флакона раствор хранить в закрытом виде при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

7.1.3 Приготовление контрольных образцов

K⁺ и K⁻ готовы к использованию.

Хранение: после вскрытия флакона контрольные образцы хранить при температуре от 20 до 25 °С до 48 ч, при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

7.1.4 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата подбирается для каждой серии тест-системы.

При постановке ИФА на полном планшете из флакона с Кг отобрать объем конъюгата, указанный в таблице для полного планшета (12 стрипов) и перенести его во флакон с РБР-К. Раствор тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

При постановке ИФА на одном или нескольких стрипах разборного планшета в чистый флакон отобрать необходимый объем РБР-К и добавить соответствующий объем конъюгата, исходя из приведенной выше таблицы. Раствор тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

Рабочий раствор конъюгата готовится непосредственно перед использованием и хранению не подлежит. При использовании нескольких стрипов планшета остаток конъюгата хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

7.1.5 Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

При постановке ИФА на полном планшете из флакона с ТМБ отобрать 650 мкл раствора и перенести его во флакон с БРС, тщательно перемешать.

В случае использования одного или нескольких стрипов планшета в чистый флакон отобрать необходимый объем БРС и добавить соответствующий объем ТМБ (см. таблицу).

Хранение: рабочий раствор тетраметилбензидина хранить при температуре от 20 до 25 °С в защищенном от света месте до 20 мин, остаток концентрата ТМБ хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

Внимание! Отбирать концентрат ТМБ только новыми наконечниками для пипеток.

7.1.6 Приготовление стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию.

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

7.1.7 Использование планшета с иммобилизованным антигеном

Перед вскрытием пакет с планшетом необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 20 до 25 °С. При использовании нескольких стрипов оставшиеся стрипы планшета хранить в герметично закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

Хранение: не более 3 ч при температуре от 20 до 25 °С.

7.2. Проведение иммуноферментного анализа

ПЕРВАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.1. В лунки A1 и B1 планшета внести по 100 мкл K⁺ контрольного положительного образца, в лунки C1, D1 и E1 внести по 100 мкл K⁻ контрольного отрицательного образца, в лунку F1 внести 90 мкл РБР-С для контроля конъюгата. В остальные лунки планшета внести по 90 мкл РБР-С и по 10 мкл образцов исследуемых сывороток и тщательно перемешать пипетированием. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 10 раз.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение 10-15 мин.

После этого планшет закрыть пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1) °С.

Внимание! Пленка предназначена для одноразового использования!

7.2.2. По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т пять раз с помощью автоматического промывателя или многоканальной пипетки, при этом в каждую лунку планшета вносить не менее 300 мкл раствора в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 10 сек, по окончании промывки остатки жидкости удалить, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

ВТОРАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.3. В каждую лунку планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см. приготовление п.7.1.4). Планшет закрыть пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1) °С.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.2.4 По окончании второй инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т 5 раз и удалить остатки влаги из планшета (см. п.7.2.2).

ТРЕТЬЯ (ФЕРМЕНТАТИВНАЯ) СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.5. Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см. приготовление п.7.1.5). Планшет поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре (37±1) °С.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора

Во избежание ложных результатов при раскатывании рабочего раствора тетраметилбензидина:

- а) не касайтесь стенок лунок планшета наконечниками;
б) избегайте образования аэрозолей и попадания субстратной смеси на внутренний фильтр пипетки.

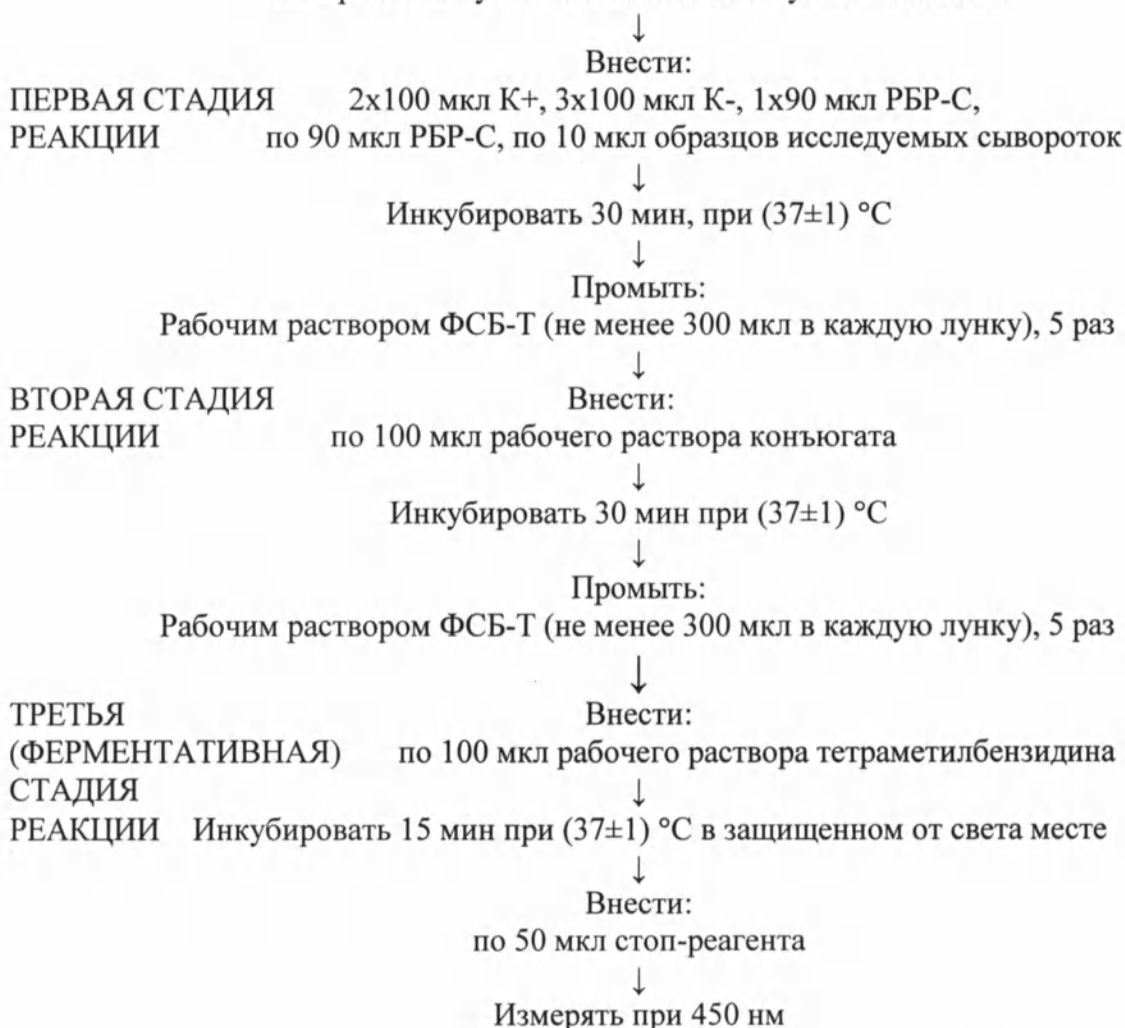
7.2.6 Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

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

Схема проведения анализа

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном *Chlamydia trachomatis*



8. Регистрация результатов анализа

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху. Измерение проводят сразу или в течение 15 мин после остановки реакции.

9. Учет и оценка результатов

Результаты учитывают только в том случае, если:

- среднее значение ОП в лунках с контролем конъюгата ОПККг не превышает 0,15;
- среднее значение в лунках с K⁻ ОПК⁻ (ср.) не более 0,2;
- среднее значение в лунках с K⁺ ОПК⁺ (ср.) не менее 0,7.

В противном случае исследование необходимо повторить.

На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности (ОПкрит).

ОПкрит. рассчитывают по формуле:

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

Исследуемые образцы сывороток оценивают по величине оптической плотности (ОП образца) в соответствии с таблицей.

Оптическая плотность сыворотки	Результат
от 0 до $0,85 \times \text{ОПкрит}$	отрицательный
от $0,85 \times \text{ОПкрит}$ до $1,15 \times \text{ОПкрит}$	сомнительный
от $1,15 \times \text{ОПкрит}$ до $2 \times \text{ОПкрит}$	слабоположительный
от $2 \times \text{ОПкрит}$ до $3 \times \text{ОПкрит}$	положительный
более $3 \times \text{ОПкрит}$	сильноположительный

Образец считают сомнительным, если оптическая плотность исследуемого образца сыворотки находится в интервале от $0,85 \times \text{ОПкрит}$ до $1,15 \times \text{ОПкрит}$. Такую сыворотку рекомендуется исследовать повторно. Если результат будет опять сомнительным, следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2 - 4 недели. В случае повторного получения сомнительного результата такой образец считать отрицательным.

Пациентам с положительными результатами рекомендуется дополнительное обследование. Для подтверждения диагноза необходимо исследовать анализируемые образцы на наличие антигена *Chlamydia trachomatis* методом ИФА или ДНК *Chlamydia trachomatis* методом ПЦР-анализа. Совокупность результатов ИФА, ПЦР, клинических исследований позволяет поставить окончательный диагноз хламидийной инфекции

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Набор реагентов «Хламидиоз-IgM-трахоматис» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2 - 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

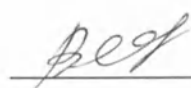
Срок годности набора реагентов 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование производить при температуре 2 - 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С в течение 10 сут. На дальние расстояния только авиатранспортом.

По вопросам, касающимся качества набора «Хламидиоз-IgM-трахоматис», следует обращаться в ООО «ИмДи-спектр» по адресу:

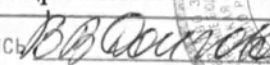
630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-он, п. Кольцово, д.2а;
тел/факс (383) 336-76-23

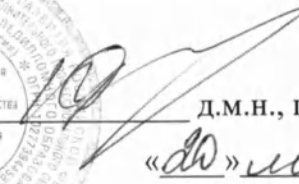
Начальник производства
ООО «ИмДи-спектр»

 В.Г. Майданюк
« 3 » августа 2012 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России

Подпись 
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись 

 д.м.н., профессор В.В. Долгов
« 20 » марта 2012 г.

Пронумеровано,
прошнуровано и опечатано
7 листов

Директор
ООО «ИмДи-спектр»

« 8 » июля 2012 г.

