

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 200__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор
ООО «ИмДи-спектр»
П.А. Кривенчук
_____ 200__ г.
Инструкции, утвержденной



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
«Хламидиоз-IgG-трахоматис»,
тест-система иммуноферментная
для выявления видоспецифических антител класса G к *Chlamydia trachomatis*

1. Назначение

Выявление видоспецифических антител класса G к *Chlamydia trachomatis* в сыворотке или плазме крови человека.

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Принцип действия набора реагентов «Хламидиоз-IgG-трахоматис» основан на непрямом иммуноферментном анализе. Анализ проводят в две стадии. На первой стадии исследуемые образцы инкубируют в лунках планшета с иммобилизованным рекомбинантным антигеном основного белка наружной мембраны (MOMP) *Chlamydia trachomatis*. Если в сыворотке (плазме) содержатся антитела к *Chlamydia trachomatis*, образуется комплекс антиген-антитело. После промывки планшета на второй стадии в лунки планшета вносят антивидовой конъюгат (моноклональные мышиные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена), который связывается с антителами класса G к *Chlamydia trachomatis*. 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

Иммуносорбент – рекомбинантный антиген основного белка наружной мембраны (MOMP) *Chlamydia trachomatis*, сорбированный в лунках разборных или неразборных полимерных 96 – луночных планшетов - 1 шт..

К+ - контрольный положительный образец - сыворотка крови человека, содержащая антитела класса G к *Chlamydia trachomatis* и не содержащая антиген ВИЧ, HBsAg и антитела к ВИЧ 1,2 и к вирусу гепатита С (ВГС); инактивированная, прозрачная красного цвета жидкость: 1,0 мл - 1 фл..

К- - контрольный отрицательный образец - сыворотка крови человека, не содержащая антитела класса G к *Chlamydia trachomatis*, антитела к ВИЧ 1,2, антитела к

к ВГС, антиген ВИЧ и HBsAg; инактивированная, прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость: 1,0 мл - 1 фл..

Кг - конъюгат - мышинные моноклональные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; прозрачная вязкая синего цвета жидкость: 0,6 мл - 1 фл..

РБР-С - буферный раствор для разведения сывороток; прозрачная синего цвета жидкость, допускается выпадение осадка, растворяющегося при тщательном встряхивании: 10,0 мл - 1 фл..

РБР-К - буферный раствор для разведения конъюгата; прозрачная желтого цвета жидкость, допускается выпадение осадка, растворяющегося при тщательном встряхивании: 13,0 мл - 1 фл..

ФСБ-Т (концентрат x25) - 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином; прозрачная, слегка опалесцирующая, бесцветная жидкость, допускается выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при нагревании температуре 37 °С в течение 30 мин: 26 мл - 1 фл..

БРС - буферный раствор для субстрата; прозрачная бесцветная жидкость: 13,0 мл - 1 фл..

ТМБ - хромоген - тетраметилбензидин; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость: 0,7 мл - 1 фл..

Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость: 6 мл - 1 фл..

3. Аналитические и диагностические характеристики

Набор реагентов должен выявлять антитела класса G к *Chlamydia trachomatis* во всех сыворотках стандартной панели, содержащих иммуноглобулины класса G к *Chlamydia trachomatis* -ОСО 42-28-313-00-чувствительность - 100%, и не давать ложноположительных результатов при исследовании сывороток этой же стандартной панели, не содержащих иммуноглобулины класса G к *Chlamydia trachomatis* - специфичность - 100%

Набор реагентов «Хламидиоз-IgG-трахоматис» - тест-система иммуноферментная для выявления видоспецифических антител класса G к *Chlamydia trachomatis* в сыворотке или плазме крови человека, позволяет определить титр специфических антител, обеспечивает полную диагностику хламидиоза. Наличие IgG-антител отражает общую картину позитивного иммунного ответа в случаях текущей, хронической или перенесенной инфекции. Высокие уровни антихламидийных IgG диагностически важны при хронических или системных инфекциях. Использование тест-системы позволяет осуществить мониторинг эффективности проводимой терапии.

Набор реагентов «Хламидиоз-IgG-трахоматис» рассчитан на 96 определений, включая контрольные образцы.

4. Меры предосторожности

Предупреждение! Набор реагентов «Хламидиоз-IgG-трахоматис» является полностью биологически безопасным, вместе с тем при проведении исследований необходимо соблюдать правила работы с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках, спецодежде;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы подвергать обработке раствором спирта этилового с объемной долей 70 % или раствором водорода перекиси с массовой долей 6 % с последующей выдержкой не менее 2 ч при температуре от 20 до 25 °С.

5. Оборудование и материалы

- фотометр;
- термостат;

- таймер;
- рН-метр;
- вошер;
- пипетки-дозаторы одноканальные и многоканальные, диапазоны измерений 0,5 – 10 мкл, 5 – 50 мкл, 20 – 200 мкл, 100 - 1000 мкл с погрешностью измерения не более указанной в паспорте на данное оборудование;
- стаканы стеклянные вместимостью 0,05 л;
- цилиндры мерные вместимостью 0,5; 1,0 л;
- вода дистиллированная.

6. Анализируемые образцы

Для выявления видоспецифических антител класса G к *Chlamydia trachomatis* используют сыворотку (плазму) крови человека как свежеприготовленную, так и хранившуюся в течение 24 ч при температуре от 2 до 8 °С или не более трех месяцев при температуре минус 20 °С.

Для проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы крови человека объемом не менее 60 мкл.

Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность бактериального пророста. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования. Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией. Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов. Не допускать тестирования пула, содержащего несколько образцов сывороток. Каждый образец сыворотки или раствора необходимо отбирать новым наконечником. Для отбора исследуемых проб и компонентов применять автоматические пипетки с погрешностью измерения объема не более 5 %.

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.

Для проведения анализа дополнительно требуются следующие материалы:

- вода дистиллированная или деионизованная;
- спирт этиловый и водорода перекись;
- резиновые перчатки.

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

7.1 Приготовление реагентов и растворов

7.1.1 Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т

Содержимое одного флакона с ФСБ-Т(концентрат х25) перенести в мерный цилиндр вместимостью 1 л и довести объем раствора до 650 мл дистиллированной водой. При наличии во флаконе с ФСБ-Т(концентрат х25) осадка солей флакон с концентратом выдержать при температуре 37 °С до полного растворения солей.

В случае использования одного или нескольких стрипов разборного планшета в мерный цилиндр внести ФСБ-Т(концентрат х25) из флакона и добавить дистиллированную воду в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

	Количество используемых стрипов, шт.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т (концентратх25), мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Вода дистиллиро- ванная, 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

Хранение: неиспользованный ФСБ-Т(концентрат х25) хранить в течение срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С, рабочий раствор ФСБ-Т – в течение месяца при температуре от 2 до 8 °С в плотно закрытой стеклянной посуде.

7.1.2 Подготовка К+, К-,РБР-С, РБР-К, БРС, стоп-реагента

К+, К-,РБР-С, РБР-К, БРС, стоп-реагент - готовы к употреблению.

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

7.1.3 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Из флакона с концентратом Кг отобрать указанный на этикетке объем (V – объем концентрата Кг в мл) и перенести его во флакон с РБР-К. Раствор тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

В случае использования одного или нескольких стрипов разборного планшета конъюгат добавлять, исходя из таблицы 2 (где V – объем конъюгата в мл, указанный на флаконе).

Таблица 2

Количество используемых стрипов, шт.	1 – 4	5 – 8	9 - 12
Кг	1/3 V	2/3 V	V
РБР-К, мл	4,3	8,7	13,0

Хранение: рабочий раствор конъюгата готовят непосредственно перед использованием. Рабочий раствор конъюгата хранению не подлежит. При использовании части стрипов планшета данного набора остаток концентрата Кг хранить в течение срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С во флаконе.

7.1.4 Приготовление рабочего раствора хромогена

Раствор ТМБ готовить непосредственно перед использованием в защищенном от света месте.

ТМБ используется в рабочем разведении 1:20. Отобрать 650 мкл раствора ТМБ и перенести во флакон с 13 мл БРС, тщательно перемешать. Хранение: рабочий раствор хромогена хранят при температуре от 20 до 25 °С в защищенном от света месте до 20 мин.

В случае использования одного или нескольких стрипов разборного планшета в чистый флакон отобрать необходимое количество БРС и добавить соответствующий объем ТМБ, исходя из таблицы 3.

Таблица 3

Количество используемых стрипов, шт.	1 - 4	5 - 8	9 - 12
БРС, мл	4,2	8,8	13,0
ТМБ, мл	0,21	0,440	0,650

Хранение: приготовленный раствор хромогена до 20 мин при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте. При использовании части стрипов планшета данного набора остаток ТМБ хранить в течение срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С во флаконе.

Внимание! Отбирать концентрат ТМБ только новыми наконечниками для пипеток.

7.1.5 Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: не ограничено.

7.2 Проведение ИФА

7.2.1 Планшет промыть один раз рабочим раствором ФСБ-Т с помощью автоматического промывателя (вошера) или многоканальной пипетки, при этом в каждую лунку планшета вносить не менее 250 мкл рабочего промывочного раствора в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 10 сек, по окончании промывки остатки жидкости удалить, активно постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

7.2.2 В лунки планшета A1 и B1 внести по 100 мкл K+, в лунки C1 и D1 внести по 100 мкл K-. В остальные лунки планшета внести по 60 мкл РБР-С. Лунку E1 оставить с РБР-С для контроля конъюгата. В остальные лунки планшета внести по 40 мкл исследуемых образцов сывороток. Раствор перемешать пять раз пипетированием.

После этого планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.3 По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т пять раз, как описано в п.4.1.

7.2.4 После промывки и удаления влаги в каждую лунку планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см. приготовление п.2.3).

Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.5 По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т пять раз, как описано в п.4.1.

7.2.6 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора хромогена (см. приготовление п.2.4).

Планшет закрыть крышкой или заклеить клейкой лентой и поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре 37 °С.

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

8. Регистрация результатов

Результаты ИФА регистрируют сразу, но не позднее 15 мин после добавления стоп-реагента, с помощью спектрофотометра. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм.

9. Учет и оценка результатов

Результаты учитывают только в том случае, если значение ОП в лунке с контролем конъюгата ОПККг не более 0,15; в лунках с K- среднее значение ОПК-(ср) не более 0,2; в лунках с K+ среднее значение ОПК+(ср) не менее 1,0. При несоблюдении данных условий исследование необходимо повторить.

ОПкрит. рассчитывают по формуле:

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

где ОПК-(ср.) – среднее значение суммы ОП (ОПК-), измеренное в лунках с K-.

Исследуемые образцы считаются положительными, если ОП обр. $\geq$ ОПкрит.

Соответствие величин индекса оптической плотности титрам IgG к Chlamydia trachomatis

Индекс	Интерпретация результатов	Титр
ОП образца < 0,9 ОПкрит.	Отрицательный результат. Указывает, что исследуемый образец либо не содержит антител класса G к Chlamydia trachomatis, либо уровень антител не детектируется. При этом образцы могут содержать антитела класса A или M к Chlamydia trachomatis	Менее 1:2,5
0,9 ОПкрит. < ОП образца < 1,2 ОПкрит.	Сомнительный результат «серая зона». Повторить анализ. Если повторное исследование выявило, что ОП образца меньше ОПкрит. – результат считается отрицательным. Если ОП образца больше ОПкрит., то руководствуются п.3	1:2,5
1,2 ОПкрит. < ОП образца < 3,5 ОПкрит.	Слабоположительный результат. Указывает либо на постинфекционный период, либо раннюю стадию сероконверсии. Рекомендуется провести повторное исследование пациента через 2-3 недели	1:5 – 1:10
3,5 ОПкрит. < ОП образца < 5 ОПкрит.	Положительный	1:10 – 1:15
5 ОПкрит. < ОП образца < 7,5 ОПкрит.	Положительный	1:15 – 1:20
7,5 ОПкрит. < ОП образца	Высоко положительный	1:40

Полуколичественный анализ результатов ИФА

1) Расчет индекса титра (ИТ) при значении ОП исследуемых образцов $\leq 2,0$ и при исходном стартовом разведении сыворотки 1:2,5

$$\text{ИТ} = 2,75 \times \text{ОП образца} / \text{ОПкрит.} \quad (1)$$

Пример – ОП образца = 1,186; ОПкрит. = 0,264, при этом $\text{ИТ} = 2,75 \times 1,186 : 0,264 = 12,35$

2) Расчет ИТ при значении ОП исследуемого образца $> 2,0$. Исследуемый образец анализируют снова, используя при этом более высокие стартовые разведения. Для этого исследуемые сыворотки предварительно разводят в соотношении 1:2, или 1:4, или 1:8. Дальнейший анализ предварительно разведенной сыворотки с ОП $< 2,0$ проводят согласно инструкции по применению набора (объем сыворотки – 40 мкл, дополнительное рабочее разведение 1:2,5).

$$\text{ИТ} = \text{Кразв.} \times 2,75 \times \text{ОП образца} / \text{ОПкрит.} \quad (2)$$

где Кразв. – коэффициент предварительного разведения сыворотки (1:2, 1:4, 1:8 и т.д.)

Пример – сыворотку со значением ОП = 2,602 предварительно развести 1:4, при постановке ИФА получают ОП образца = 1,127, ОПкрит. = 0,271, при этом $\text{ИТ} = 4 \times 2,75 \times 1,127 : 0,271 = 45,74$

Примечания

1. Для разведения сывороток использовать РБР-С, входящий в состав набора тест-системы.
2. ИТ, рассчитанные по формулам, приведенным выше, близки к истинным значениям титров сывороток, анализируемых с помощью тест-системы, но иногда могут не совпадать из-за индивидуальных особенностей исследуемой сыворотки.
3. Для удобства регистрации результатов рекомендуется округление значений титров.

Пример – ИТ = 42,7, что соответствует титру сыворотки 1:40; ИТ = 147,5, что соответствует титру сыворотки 1:150.

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Тест-систему выпускают в виде набора, упакованного в пачку из картона, куда вкладывают инструкцию по применению.

Условия отпуска - для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Срок годности тест-системы 6 мес. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Хранение в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование производить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 5 дней. На дальние расстояния только авиатранспортом.

Рекламации на качество наборов направлять по адресу: 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора, тел. (495) – 241-39-22, факс (495)-241-92-38 и на предприятие-изготовитель ООО «ИмДи-спектр» - 630559, Новосибирская область, Новосибирский район, Кольцово, д. 2а, а/я 172; тел/факс (383)-336-76-23.

Начальник производства
ООО «ИмДи-спектр»



В.Г. Майданюк

"__" ____ 200__ г.

Зав. лабораторией СиК МБП
против арбовирусов, риккетсиозов,
хламидиозов и СПИД ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича

М.С. Воробьева

"__" ____ 200__ г.

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Тест-систему выпускают в виде набора, упакованного в пачку из картона, куда вкладывают инструкцию по применению.

Условия отпуска - для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Срок годности тест-системы 6 мес. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Хранение в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование производить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 5 дней. На дальние расстояния только авиатранспортом.

Рекламации на качество наборов направлять по адресу: 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора, тел. (495) – 241-39-22, факс (495)-241-92-38 и на предприятие-изготовитель ООО «ИмДи-спектр» - 630559, Новосибирская область, Новосибирский район, Кольцово, д. 2а, а/я 172; тел/факс (383)-336-76-23.

Начальник производства
ООО «ИмДи-спектр»



В.Г. Майданюк

"__" ____ 200__ г.

Зав. лабораторией СиК МБП
против арбовирусов, риккетсиозов,
хламидиозов и СПИД ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича



М.С. Воробьева

"__" ____ 200__ г.

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Тест-систему выпускают в виде набора, упакованного в пачку из картона, куда вкладывают инструкцию по применению.

Условия отпуска - для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Срок годности тест-системы 6 мес. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Хранение в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование производить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 5 дней. На дальние расстояния только авиатранспортом.

Рекламации на качество наборов направлять по адресу: 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора, тел. (495) - 241-39-22, факс (495)-241-92-38 и на предприятие-изготовитель ООО «ИмДи-спектр» - 630559, Новосибирская область, Новосибирский район, Кольцово, д. 2а, а/я 172; тел/факс (383)-336-76-23.

Начальник производства
ООО «ИмДи-спектр»



В.Г. Майданюк

"__" ____ 200__ г.

Зав. лабораторией СИК МБП
против арбовирусов, риккетсиозов,
хламидиозов и СПИД ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича

М.С. Воробьева

"__" ____ 200__ г.

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Тест-систему выпускают в виде набора, упакованного в пачку из картона, куда вкладывают инструкцию по применению.

Условия отпуска - для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Срок годности тест-системы 6 мес. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Хранение в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование производить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 5 дней. На дальние расстояния только авиатранспортом.

Рекламации на качество наборов направлять по адресу: 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора, тел. (495) – 241-39-22, факс (495)-241-92-38 и на предприятие-изготовитель ООО «ИмДи-спектр» - 630559, Новосибирская область, Новосибирский район, Кольцово, д. 2а, а/я 172; тел/факс (383)-336-76-23.

Начальник производства
ООО «ИмДи-спектр»



В.Г. Майданюк

"__" "__" 200__ г.

Зав. лабораторией СИК МБП
против арбовирусов, риккетсиозов,
хламидиозов и СПИД ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича

М.С. Воробьева

"__" "__" 200__ г.