

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов

"ИФА-антиХламидия"

Тест-система иммуноферментная для выявления антител
к *Chlamydia trachomatis*

Комплект № 3. "ИФА-антиХламидия-IgG", Тест-система иммуноферментная
для выявления антител класса G к *Chlamydia trachomatis*

Регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1697 от 17.06.2014 г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление антител классов А, М и G к *Chlamydia trachomatis* в сыворотке (плазме) крови человека методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Выпускается в трех базовых вариантах комплектации:

Комплект № 1. "ИФА-антиХламидия-IgA", Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса А к *Chlamydia trachomatis*.

Комплект № 2. "ИФА-антиХламидия-IgM", Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к *Chlamydia trachomatis*.

Комплект № 3. "ИФА-антиХламидия-IgG", Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса G к *Chlamydia trachomatis*.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	рекомбинантный антиген с концевым фрагментом основного белка наружной мембраны (МOMP) <i>Chlamydia trachomatis</i> , сорбированный на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном	компл. № 1	компл. № 2	компл. № 3
		1 планшет	1 планшет	1 планшет
<i>допускается отдельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)</i>				
Контрольный положительный образец (K ⁺)	инактивированный; прозрачная бесцветная или светло-желтая жидкость	1 фл. (1,0 мл)	-	1 фл. (1,0 мл)
	инактивированный; прозрачная бесцветная или малинового цвета жидкость	-	1 фл. (1,5 мл)	-
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	инактивированный; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)
Конъюгат	антитела моноклональные мышинные против иммуноглобулинов человека класса А, М,	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)

	G, меченые пероксидазой хрена; прозрачная жидкость красного цвета			
Раствор для разведения конъюгата (РРК)	прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка, исчезающего при перемешивании.	1 фл. (14 мл)	1 фл. (14 мл)	1 фл. (14 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	прозрачная жидкость фиолетового цвета, возможно выпадение осадка, исчезающего при перемешивании	1 фл. (14 мл)	1 фл. (14 мл)	1 фл. (14 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин.	1 фл. (40 мл)	1 фл. (40 мл)	1 фл. (40 мл)
Цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБР)	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (14 мл)	1 фл. (14 мл)	1 фл. (14 мл)
Хромоген (ТМБ)	раствор тетраметилбензидина; прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (12,5 мл)	1 фл. (12,5 мл)	1 фл. (12,5 мл)

Примечания.

1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.
2. ФСБ-Т(x25), ЦБР, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование разных серий этих реагентов или их смешение.

Набор может быть дополнительно укомплектован:

вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),
 одноразовыми наконечниками для автоматических пипеток (16 шт.)
 клейкой пленкой для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант всех комплектов набора позволяет одномоментное исследование 96 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 3 лунки). Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Число испл. обр.	1-5	6-13	14-21	22-29	30-37	38-45	46-53	54-61	62-69	70-77	78-85	86-93

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемом образце антител класса А, М или G к антигенам *Chlamydia trachomatis* они связываются с антигеном иммуносорбента с образованием иммунных комплексов, которые затем выявляются с помощью конъюгатов - антител к IgA, IgM или IgG человека, меченных пероксидазой хрена, по цветной реакции с тетраметилбензидином. Изменение оптической плотности реакционной смеси регистрируется спектрофотометрически.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Нативная сыворотка, плазма крови (гепаринизированная, с ЭДТА, цитратная, оксалатная) человека объемом не менее 20 мкл.

Образцы сыворотки (плазмы) крови до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С и 3 мес при температуре минус 20 °С или более низкой. Допускается только однократное замораживание-размораживание образцов. Размороженные образцы перед исследованием необходимо тщательно перемешать.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов, с признаками гемолиза или с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед исследованием отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Комплект № 1

Специфичность комплекта определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, (СОП-157) как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Чувствительность комплекта определяется по стандартной панели положительных сывороток предприятия, (СОП-157-IgA⁺), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Комплект № 2

Специфичность комплекта определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, (СОП-157) как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Чувствительность комплекта определяется по стандартной панели положительных сывороток предприятия, (СОП-157-IgM⁺), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Комплект № 3

Специфичность комплекта определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, (СОП-157) как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Чувствительность комплекта определяется по стандартной панели положительных сывороток предприятия, (СОП-157-IgG⁺), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Диагностическая чувствительность набора составила не менее 97%. **Диагностическая специфичность** – не менее 99%. По данным клинических испытаний, проанализировано по 500 образцов в каждом комплекте набора реагентов, из них – 96 положительных, 404 – отрицательных. **Воспроизводимость** – 100%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания его на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" и МУ-287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

"РУЧНАЯ" ПОСТАНОВКА

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин, термостат на 37 °С, вошер автоматический, холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез. растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление рабочего промывающего раствора (ФСБ-Т)

ФСБ-Т(х25) интенсивно перемешать, при выпадении осадка солей в прогреть при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

При использовании всего планшета содержимое флакона с ФСБ-Т(х25) довести водой очищенной до 1 л.

При дробной постановке использовать соотношения объемов ФСБ-Т(х25) и воды, указанные в табл. 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ФСБ-Т(х25), мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37
Вода очищенная, мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

Приготовление рабочего разведения конъюгата

Готовить не менее чем за 10 мин до использования.

При использовании всего планшета тщательно перемешать содержимое флакона с РРК (14 мл) и добавить в него мкл конъюгата (объем вносимого конъюгата указывается для каждой серии набора), тщательно перемешать.

При дробной постановке использовать соотношения объемов РРК и конъюгата, указанные в табл. 2 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 2

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
РРК, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Конъюгат, мкл											

Примечание. Объемы вносимого конъюгата указываются для каждой серии набора.

Рабочее разведение конъюгата стабильно не менее 3 ч при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление субстратно-индикаторного раствора

Готовить непосредственно перед использованием в месте, защищенном от воздействия прямого солнечного света.

При использовании целого планшета содержимое флакона с ТМБ (0,7 мл) внести во флакон с ЦБР (14,0 мл), тщательно перемешать.

При дробной постановке использовать соотношения объемов ЦБР и ТМБ, указанные в табл. 3 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 3

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
---------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----

ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ТМБ, мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550

Субстратно-индикаторный раствор стабилен не менее 3 ч при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, К⁺, К⁻, РРО, РРК, стоп-реагент – готовы к применению. РРО перед использованием обязательно перемешивать.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Проведение ИФА

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из упаковки рамку планшета и необходимое число стрипов. Неиспользованные стрипы допускается хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 до 8 °С до конца срока годности.

2. Во все лунки рабочего планшета (кроме 1 лунки комплекта № 2, например: лунки А1) внести по 80 мкл РРО.

В одну лунку (например: А1) (комплектов №1,3) внести 20 мкл К⁺,
(комплекта №2) внести 100 мкл К⁺,

в две лунки (например В1 и С1) – по 20 мкл К⁻.

В оставшиеся лунки внести по 20 мкл исследуемых образцов, перемешивая после внесения содержимое лунок пипетированием.

3. Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в течение 30 мин при 37°С.

4. С помощью промывателя удалить содержимое лунок, 5 раз промыть планшет ФСБ-Т, внося в лунки 350-370 мкл раствора. При наличии автоматического промывателя производить промывку в режиме "Overflow". По окончании промывки удалить остатки влаги из лунок, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата.

6. Планшет заклеить новым листом пленки или закрыть крышкой и инкубировать в течение 30 мин при 37 °С.

7. Удалить содержимое лунок с помощью промывателя, затем планшет 5 раз промыть ФСБ-Т, как описано в п. 4.

8. Во все лунки внести по 100 мкл субстратно-индикаторного раствора, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и выдержать 20 мин при температуре от 18 до 25 °С.

9. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился субстратно-индикаторный раствор) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и не более чем через 10 мин приступить к учету результатов.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать на автоматическом спектрофотометре, измеряя оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм (допустимо использование фильтра сравнения с длиной волны 620-650 нм). Выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху

Результаты ИФА учитывать при следующих условиях:

значение $ОП_{K+}$ – не менее 0,60;

среднее значение $ОП_{K-}$ – не более 0,20.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Рассчитать $ОП_{крит}$ по формуле

$$ОП_{крит} = ОП_{K-} + 0,25 ,$$

где $ОП_{K-}$ – среднее значение ОП в лунках с K⁻.

Отрицательные значения ОП K⁻ и исследуемых образцов (со знаком «-») при расчёте $ОП_{крит}$ и анализе результатов считать равными «0,000».

Интерпретация результатов

Комплект № 1

ОП образца	Результат	Титр IgA
от 0 до (ОП _{крит} - 0,05)	отрицательный	менее 1:5
от (ОП _{крит} - 0,05) до (ОП _{крит} +0,05)	сомнительный	1:5
от (ОП _{крит} +0,06) до 3хОП _{крит}	слабоположительный	1:10
от 3,1хОП _{крит} до 5хОП _{крит}	положительный	1:20
от 5,1хОП _{крит} до 7хОП _{крит}	положительный	1:40
от 7,1хОП _{крит} до 9хОП _{крит}	положительный	1:80
более 9хОП _{крит}	положительный	1:160

Комплект № 2

ОП образца	Результат	Титр IgM
от 0 до (ОП _{крит} - 0,05)	отрицательный	-
от (ОП _{крит} - 0,05) до (ОП _{крит} +0,05)	сомнительный	-
от (ОП _{крит} +0,06) до 2хОП _{крит}	слабоположительный	1:100
от 2,1хОП _{крит} до 3хОП _{крит}	положительный	1:200
от 3,1хОП _{крит} до 4хОП _{крит}	положительный	1:400
от 4,1хОП _{крит} до 5хОП _{крит}	положительный	1:800
от 5,1хОП _{крит} до 6хОП _{крит}	положительный	1:1600
от 6,1хОП _{крит} до 7хОП _{крит}	положительный	1:3200

Комплект № 3

ОП образца	Результат	Титр IgG
от 0 до (ОП _{крит} -0,05)	отрицательный	менее 1:2,5
от (ОП _{крит} -0,05) до (ОП _{крит} +0,05)	сомнительный	1:2,5
от (ОП _{крит} +0,06) до 2хОП _{крит}	слабоположительный	1:5
от 2,1хОП _{крит} до 3,5хОП _{крит}	положительный	1:10
от 3,6хОП _{крит} до 5хОП _{крит}	положительный	1:20
от 5,1хОП _{крит} до 7хОП _{крит}	положительный	1:40
от 7,1хОП _{крит} до 9хОП _{крит}	положительный	1:80
более 9хОП _{крит}	положительный	1:160

Рекомендуется повторное исследование сывороток, давших сомнительные результаты.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести исследование.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение – в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Транспортирование – при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества набора "ИФА-антиХламидия", следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК и в учреждение, уполномоченное Росздравнадзором на проведение государственного контроля качества указанной продукции.

**КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА
(все комплекты)**

<u>Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!</u>	
Внести	во все лунки (кроме лунки А1 комплекта № 2) по 80 мкл РРО в лунку А1 - 20 мкл К ⁺ (комплекты №1,3) или 100 мкл К ⁺ (комплект №2) в лунки В1, С1 - по 20 мкл К ⁻ ; в оставшиеся лунки - по 20 мкл исследуемых образцов
Инкубация	30 мин, 37 °С
Промыть	5 раз промывочным раствором
Внести	по 100 мкл конъюгата в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 37 °С
Промыть	5 раз промывочным раствором
Внести	по 100 мкл субстратно-индикаторного раствора в каждую лунку
Инкубация	20 мин, 18-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по воздуху