

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG антител К АНТИГЕНАМ CHLAMYDIA SPP. В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «CHLAMYDIA IgG-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Chlamydia IgG-ИФА» предназначен для качественного определения концентрации IgG антител к антигенам *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydia pneumoniae* в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Род *Chlamydia* (хламидии) – облигатные внутриклеточные паразиты, имеющие сходство с Грам-отрицательными бактериями. В род *Chlamydia* входит три вида: *C.trachomatis*, *C.psittaci* и *C.pneumoniae* (TWAR), несущие общие антигенные детерминанты. *C.trachomatis* вызывает заболевания, передающиеся половым путем, которые могут приводить к серьезным нарушениям репродуктивной сферы, включая хроническое воспаление в органах малого таза и бесплодие. Этот вид может также вызывать конъюнктивит и кератит у детей и новорожденных, родившихся у инфицированной матери. *C.psittaci* передается человеку от инфицированных птиц (голубей, попугаев) и вызывает атипичную пневмонию (орнитоз). *C.pneumoniae* может вызывать как острое поражение респираторного тракта (пневмонию), так и хронические бронхиты. По причине внутриклеточной локализации и размножения, инфекции, вызываемые хламидиями, часто протекают бессимптомно и рецидивируют. Специфические IgG-антитела к антигенам хламидий не являются протективными (не защищают от рецидива или повторного инфицирования), но их титр в сыворотке крови обычно отражает степень активности размножения хламидий; поэтому определение IgG-антител может быть использовано для мониторинга данных инфекций. Повышенные титры IgG-антител в сыворотке крови могут определяться через 3-4 недели после начала заболевания, несмотря на успешную антимикробную терапию. Данная тест-система неспособна различить IgG-антитела против различных видов рода *Chlamydia*.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgG антител к антигенам *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydia pneumoniae* основано на использовании непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизован антиген – *Chlamydia*. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации специфических IgG антител к антигенам *Chlamydia* spp. Концентрация IgG антител к антигенам *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydia pneumoniae* в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Использование высокоочищенного препарата позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG антител к антигенам *Chlamydia* spp. в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «*Chlamydia* IgG-ИФА» не превышает 8.0 %.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	R105Z	ПЛАНШЕТ 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	CQ105Z	Калибровочная проба на основе трис-буфера (рН 7.2–7.4), содержащая известное количество IgG антител к антигенам Chlamydia trachomatis и Chlamydia pneumoniae, готова к использованию, 1.0 мл	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
3	CN105Z CP105Z	Контрольные сыворотки (отрицательный и положительный контроли) на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgG антител к антигенам Chlamydia spp., готовы к использованию (1.0 мл и 1.0 мл соответственно)	2	шт.	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
4	T105Z	Конъюгат , готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5	S011Z	ИФА-Буфер , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
6	R055Z	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	S008Z	Концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	R050Z	Стоп-реагент , готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9	N003	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10	K105I	Инструкция по применению Набора реагентов «Chlamydia IgG-ИФА»	1	шт.	-
11	K105Q	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Chlamydia IgG-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5.0 % раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 20–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдерживать при комнатной температуре ($+18\dots+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2\dots+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «Chlamydia IgG-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 45 исследуемых образцов, 1 калибровочной пробы и 2 проб контрольных сывороток (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочную пробу и контрольные сыворотки после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора. Приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается. Допускается исследование сывороток, хранение которых с момента забора крови осуществлялось при температуре от +2 °С до +8 °С не более 7 суток.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации IgG антител к антигенам *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydia pneumoniae* в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

8.8. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 6 лунок для калибровочной пробы и контрольных сывороток.
2	Внесите во все лунки планшета по 80 мкл ИФА-Буфера.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 20 мкл калибровочной пробы и контрольных сывороток. В остальные лунки внесите в дубликатах по 20 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочной пробы, контрольных сывороток и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
4	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
6	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
7	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
8	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
9	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
10	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
11	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.

12	<p>Рассчитайте содержание IgG антител к антигенам <i>Chlamydia trachomatis</i> и <i>Chlamydia pneumoniae</i> в исследуемых образцах</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Рассчитайте среднее ОП калибратора; 2. Умножьте это среднее на коэффициент (Q), значение которого указано в Паспорте серии – получите граничное значение оптической плотности (ОПГ); 3. Для каждого образца вычислите коэффициент К, получаемый делением ОП образца на ОПГ. <p>При К>1.1 образец положительный, при К<0.9 – отрицательный. при значении К, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результат в пограничной зоне (+/-).</p>
----	---

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

Некоторые лаборатории на основании результатов собственных популяционных исследований вводят «второй cut-off», расположенный между анамнестическим («нормальным») и «высоким» уровнем IgG-антител, характерным для реактивации или позднего периода первичной инфекции. Значения «второго cut-off» для возрастных групп 8 месяцев – 3 года и старше 3 лет приведены в таблице ожидаемых значений.

Если значение К лежит в интервале от 1.1 до «второго cut-off», это может свидетельствовать либо о начальном периоде первичной инфекции, либо об инфекции, перенесенной ранее. Чтобы прояснить ситуацию, необходимо исследовать повторные образцы крови того же пациента, взятые через несколько недель. Нарастание титра в повторном образце свидетельствует о наличии инфекции. Если же титр не нарастает, это свидетельствует об отсутствии активной инфекции и об анамнестическом характере антител.

Исследуемая группа	Единицы, К	
	Нижний предел	Верхний предел
Серонегативные	<0.1	0.9
Серопозитивные старше 3 лет	1.1	4.9
новорожденные*	<0.1	1.8
до 8 месяцев*	<0.1	3.0
8 месяцев – 3 года	<0.1	2.7

*материнские антитела