

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgM АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ *CHLAMYDIA SPP.* В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «Chlamydia IgM-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Chlamydia IgM-ИФА» предназначен для качественного определения IgM антител к антигенам *Chlamydia spp.* в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Серологические методы диагностики хламидийной инфекции (в том числе и иммуноферментный анализ, ИФА) позволяют определить стадию и характер протекания заболевания, что особо важно при хроническом течении заболевания на протяжении многих месяцев и лет. С этой целью в ИФА определяют специфические антитела классов IgM, IgA и IgG, которые последовательно синтезируются и накапливаются в сыворотке крови и в биологических секретах человека.

1.3. Первыми с момента инфицирования в крови появляются специфические к *Chlamydia spp.* антитела класса IgM – в первые недели с момента инфицирования. Антитела этого класса являются показателем первичной инфекции *Chlamydia spp.* Специфические к *Chlamydia spp.* антитела класса IgA присутствуют как в сывороточной, так и в секреторной формах – это показатель как острой инфекции, так и манифестации при хронической форме заболевания. В сыворотке крови антитела класса IgA появляются через 10–14 дней от начала заболевания, немного раньше антител класса IgG, но в меньших концентрациях. Их можно обнаруживать в начале болезни в выделениях из половых органов. Высокие концентрации антител этого класса могут свидетельствовать о хронической инфекции. Специфические IgA антитела характеризуются периодом полураспада 5–7 дней, что позволяет использовать их для контроля эффективности лечения. Снижение уровня этих антител в 2–3 раза свидетельствует об успешно проведенной терапии.

1.4. Антитела класса IgG появляются, начиная с третьей недели от начала заболевания. Их наличие отображает общую картину иммунного ответа в результате острой, хронической или перенесенной инфекции. В последнем случае IgG могут определяться на низком уровне в течение многих лет

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgM антител к антигенам *Chlamydia spp.* основано на использовании принципа «IgM-захват» твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы моноклональные антитела к IgM. Антитела из образца связываются с антителами к IgM на твердой фазе. Образовавшийся комплекс специфически выявляют с помощью конъюгата *Chlamydia spp.* 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 IgM антител к антигенам *Chlamydia spp.* в исследуемом образце. Индекс позитивности (ИП, %) IgM антител к антигенам *Chlamydia spp.* в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Набор реагентов «Chlamydia IgM-ИФА» проверяли на образцах сывороток крови пациентов с признаками острого урогенитального хламидиоза, во всех образцах были выявлены специфические к *Chlamydia spp.* антитела класса IgG, в 82% из них выявлялись антитела класса IgM к *Chlamydia spp.*

3.2. Воспроизводимость.

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

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P10MZ	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт	-
2	CN105MZ CP105MZ	Контрольные сыворотки (отрицательный и положительный контроль) на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgM антител к антигенам <i>Chlamydia spp.</i> , готовы к использованию (0.5 мл и 0.2 мл соответственно)	2	шт	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
3	T105MXZ	Концентрат конъюгата (1.4 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
4	ST105MZ	Буфер для разведения концентрата конъюгата , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
5	SP105MZ	Буфер для разведения образцов , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость пурпурного цвета
6	R055Z	Раствор субстрата тетраметилбензидаина (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	K105MI	Инструкция по применению Набора реагентов «Chlamydia IgM-ИФА»	1	шт	-
11	K105MQ	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Chlamydia IgM-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, противоэпидемического 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;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 10–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- 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 выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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).

7.4. Приготовление конъюгата.

Приготовьте конъюгат: для этого разбавьте концентрат конъюгата в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата. ВНИМАНИЕ! Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки! Пример: 100 мкл концентрата конъюгата + 1000 мкл буфера для разведения конъюгата.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «Chlamydia IgM-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 46 исследуемых образцов 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;
- Буфер для разведения образцов, концентрат конъюгата, Буфер для разведения концентрата конъюгата, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- 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. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

8.7. 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 4 лунки для контрольных сыворток (Отрицательный контроль 3 лунки, Положительный контроль 1 лунка).
2	Приготовьте конъюгат: для этого разбавьте концентрат конъюгата в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата. ВНИМАНИЕ! Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки! Пример: 100 мкл концентрата конъюгата + 1000 мкл буфера для разведения конъюгата.
3	Внесите во все лунки планшета по 90 мкл буфера для разведения образцов.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл контрольных сыворток. В остальные лунки внесите в дубликатах по 10 мкл исследуемых образцов сывортки (плазмы) крови. Внесение контрольной сывортки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
5	ВНИМАНИЕ! При внесении образцов сывортки (плазмы) крови происходит изменение цвета раствора.
6	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
7	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.
8	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
9	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +18...+25 °С.
10	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
11	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.
12	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.

13	<p>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-реактента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.</p>
14	<p>Рассчитайте содержание IgM антител к антигенам <i>Chlamydia spp.</i> в исследуемых образцах. Для этого:</p> <ol style="list-style-type: none"> Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля: <ul style="list-style-type: none"> ОП (CN105MZ)Ср = $(\text{ОП1 (CN105MZ)} + \text{ОП2 (CN105MZ)} + \text{ОП3 (CN105MZ)}) / 3$; <p>Результаты анализа считать достоверными, если:</p> <ul style="list-style-type: none"> ОП Положительного контроля не ниже 1.5 оптических единиц (ОЕ); ОП Отрицательного контроля не выше 0.15 ОЕ во всех лунках. <ol style="list-style-type: none"> Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.2 Cut off = ОП (CN105MZ)Ср + 0.2 Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off ИП = ОПобразца / Cut off

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Интерпретация результатов:

**При ИП > 1.1 образец положительный,
при ИП < 0.9 - отрицательный.**

При значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результат в пограничной зоне (+/-).

Такие сыворотки рекомендуется исследовать повторно. Если повторный полученный результат будет неопределенным, то следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными.

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Бочкарев Е.Г. Лабораторная диагностика хламидийной инфекции. – Москва, 2002. – 38 с.
2. Кудрявцева Л.В., Мисюрина О.Ю., Генерозов Э.В. и др. Клиника, диагностика и лечение хламидийной инфекции (пособие для врачей). – Москва, 2001. – 40 с.
3. Barnes R.C. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections // Clin. Microbiol. Revs. – April, 1989. – P. 119-136.
4. Bas S., Vischer T.L. *Chlamydia spp.* antibody detection and diagnosis of reactive arthritis // British Journal of Rheumatology. – 1998. – № 37. – P. 1054-1059.
5. Black C.M. Current methods of laboratory diagnostics of *Chlamydia spp.* infection // In "Clinical Microbiology Reviews". – 1997. – P. 160-184.