«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«26» 05 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к белку теплового шока (HSP60) Chlamydia trachomatis «ХламиБест cHSP60-IgG»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к белку теплового шока (HSP60) *Chlamydia trachomatis* в сыворотке (плазме) крови человека и может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях.

Антитела к HSP60 *C. trachomatis* являются маркером хламидийной инфекции фаллопиевых труб и трубной окклюзии, и их наличие повышает вероятность неудачи экстраторального оплодотворения.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

Антиген HSP60 *C. trachomatis* иммобилизован в лунках полистироловых планшетов. При инкубации в лунках исследуемых образцов сывороток происходит специфическое связывание антител с антигеном. Несвязавшийся материал отмывают, добавляют в лунки конъюгат, после инкубации которого лунки промывают и вносят раствор ТМБ. В результате ферментативной реакции образуется окрашенный продукт. Интенсивность окраски раствора пропорциональна концентрации в лунках IgG к антигену HSP60 *C. trachomatis*.

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения $ОП_{крит}$ анализируемые образцы оцениваются как положительные, отрицательные или сомнительные.

2.2. Состав набора:

– планшет разборный с иммобилизованным рекомбинантным HSP60 *C. trachomatis* – 1 шт.;

– положительный контрольный образец ($К^+$), инактивированный – 1 фл., 0,5 мл;

– отрицательный контрольный образец ($К^-$), инактивированный – 1 фл., 1,0 мл;

– конъюгат (антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена), лиофилизированный – 1 фл. или 2 фл., или концентрат – 1 фл., 1,5 мл;

– раствор для предварительного разведения (РПР) при комплектации набора лиофилизированным конъюгатом – 1 фл., 3,0 мл;

– разводящий буфер для сывороток (РБС) – 1 фл., 13,0 мл;

– раствор для разведения конъюгата (РК) – 1 фл., 13,0 мл;

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28,0 мл;

– раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) – 1 фл., 13,0 мл;

– стоп-реагент – 1 фл., 12,0 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

– пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;

– ванночками для реагентов – 2 шт.;

– наконечниками для пипетки на 4-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса G к HSP60 *C. trachomatis* должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-187), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест», включающей образцы сывороток крови, содержащие иммуноглобулины класса G к HSP60 *C. trachomatis*: чувствительность по IgG к HSP60 *C. trachomatis* – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса G к HSP60 *C. trachomatis* должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-187), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест», включающей образцы сывороток крови, не содержащие иммуноглобулины класса G к HSP60 *C. trachomatis*: специфичность по IgG к HSP60 *C. trachomatis* – 100%.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 от 01.05.08 и МУ-287-113-00 от 29.10.98.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 655 нм;
- термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113-00.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2–8) °С не более 5 суток, либо при температуре минус (20 ± 4) °С, если необходимо более длительное хранение.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать в течение 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25) °С.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5 %.

При комплектации набора лиофилизированным конъюгатом, концентрированный раствор конъюгата должен быть приготовлен, как минимум, за 15 мин до его использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник при температуре (2–8) ºС.

Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина.

При промывке лунки (стрипа, планшета) заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через край лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 с.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор ТМБ), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

Наконечники для пипеток (автоматических дозаторов) следует использовать однократно.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Запрещается повторное использование планшета для предварительного нанесения сывороток.

Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (*четвертичных аммониевых соединений*), спиртов, третичных аминов (МУ-231-113 от 29.10.98).

Посуду (ванночки), используемые для работы с растворами конъюгата и тетраметилбензидина, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

В случае повторного использования посуду (ванночки) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки) для раствора тетраметилбензидина сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.1. Приготовление реагентов.

7.1.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см. таблицу) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

Хранение: при температуре (2–8) ºС до 5 суток.

7.1.2. Растворы конъюгата

<u>Внимание!</u> Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток.

При комплектовании набора лиофилизированным конъюгатом приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – до 1 месяца при температуре (2–8) ºС или до конца срока годности набора при минус (20±4) ºС. Допускается трехкратное замораживание.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

<u>Внимание!</u> Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

Тщательно перемешать содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (РК) без образования пены. Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество (см. таблицу) концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

Конъюгат в рабочем разведении хранению не подлежит.

При комплектовании набора концентратом конъюгата, перед приготовлением конъюгата в рабочем разведении необходимо тщательно взболтать содержимое флакона. Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество (см. таблицу) концентрата конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием до получения равномерного окрашивания.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление промывочного раствора												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, 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
Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении для лиофилизированной формы												
Концентрированный раствор конъюгата, мкл	α*	2×α	3×α	4×α	5×α	6×α	7×α	8×α	9×α	10×α	11×α	12×α
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении для концентрата												
Концентрат конъюгата, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Раствор ТМБ												
Раствор ТМБ, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

* α = ___ мкл (значение α указано в инструкции и в паспорте на данную серию наборов).

7.1.3. Раствор ТМБ

Внимание! Раствор ТМБ готов к использованию. Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с раствором ТМБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Непосредственно перед использованием отобрать в пластиковую ванночку только необходимое в соответствии с числом используемых стрипов количество раствора ТМБ (см. таблицу). Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).

Хранение: в течение всего срока годности набора при температуре (2–8) ºС.

7.2. Проведение анализа

7.2.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при температуре (2–8) ºС до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.1.1), концентрированный раствор конъюгата, если набор укомплектован лиофилизированной формой конъюгата (п. 7.1.2).

7.2.2. Перед постановкой ИФА лунки стрипов промыть 1 раз промывочным раствором, заливая в каждую лунку по 400 мкл промывочного раствора. По истечении 5 мин раствор аккуратно удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором.

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге. Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.2.3. Разводящий буфер для сывороток (РБС) тщательно взболтать. Во все лунки стрипов внести по 80 мкл РБС, в любые 2 лунки внести по 20 мкл $К^-$, в 1 лунку – 20 мкл $К^+$. Во все остальные лунки внести по 20 мкл исследуемых образцов, получая, таким образом, конечное разведение сывороток 1:5. *Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз)*.

Лунки заклеить плёнкой и инкубировать 30 мин при температуре (37 ± 1) °С.

За 5 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.1.2).

7.2.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки 5 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

<u>Внимание!</u> Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (400 мкл рабочего промывочного раствора). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

7.2.5. В каждую лунку внести по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении. Для внесения раствора конъюгата в рабочем разведении использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Стрипы заклеить липкой пленкой и инкубировать 30 мин при температуре (37±1) °С.

7.2.6. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть 5 раз промывочным раствором, удалить влагу как описано выше.

7.2.7. Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ (п. 7.1.3).

Внимание! Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, прилагаемые к набору.

Стрипы поместить на 25 мин в защищенное от света место при температуре (18-25) °С.

7.2.8. Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты измерить оптическую плотность (ОП).

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом не более 0,25 ($ОП_{ср}К^- \leq 0{,}25$).

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом не менее 0,6 ($ОПК^+ \geq 0{,}6$);

Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(К^-) + 0{,}2$$

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

где $ОП_{ср}(К^{-})$ – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

Если $ОП_{ср}$ $(К^{-})$ имеет отрицательное значение, считать её равной нулю.

Исследуемый образец оценить как:

– положительный, т.е. содержащий антитела класса G к белку теплового шока (HSP60) *Chlamydia trachomatis*, если значение $ОП_{обр} \geq ОП_{крит} + 0,05$;

– отрицательный, т.е. не содержащий антитела класса G к белку теплового шока (HSP60) *Chlamydia trachomatis*, если полученное для него значение $ОП_{обр} \leq ОП_{крит} - 0,05$;

– сомнительный, если значение ОП находится в интервале $ОП_{крит} - 0,05 < ОП_{обр} < ОП_{крит} + 0,05$.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) ºС. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2–8) ºС. Замораживание не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2–8) ºС в течение всего срока годности набора;

– контрольные образцы, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, разводящий буфер для сывороток, раствор для разведения конъюгата, раствор для предварительного разведения, раствор тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) ºС в течение всего срока годности набора;

– при комплектовании набора лиофилизированным конъюгатом концентрированный раствор конъюгата можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) ºС в течение 1 месяца с момента приготовления или при температуре минус (20±4) ºС до конца срока годности набора;

– при комплектовании набора концентратом конъюгата после вскрытия флаконов его можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) ºС в течение всего срока годности набора;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– промывочный раствор можно хранить при температуре (2-8) °С до 5 суток с момента приготовления.

По вопросам, касающимся качества набора «ХламиБест cHSP60-IgG», обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru