



REF

X-1251



96

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «ДС-ИФА-анти-ХЛАМИДИЯ TR-A»

**Тест-система иммуноферментная для выявления видоспецифических
антител класса А к *Chlamydia trachomatis***

Состав набора:

Иммуносорбент – смесь рекомбинантного антигена, аналога главного белка наружной мембраны *Chlamydia trachomatis* (МOMP) и синтетического пептида Е-78, сорбированная на стрипах планшета полистиролового разборного;

Конъюгат (концентрат х 21), жидкий - моноклональные антитела мыши к иммуноглобулину А человека, конъюгированные с пероксидазой хрена;

К+ - контрольный положительный образец, жидкий – сыворотка крови человека, инактивированная, содержащая видоспецифические антитела класса А к *Chlamydia trachomatis*, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С;

К- - контрольный отрицательный образец, жидкий – сыворотка крови человека, инактивированная, не содержащая антитела к *Chlamydia trachomatis*, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С;

БР - блок-раствор для рабочего разведения исследуемых сывороток;

РРК - раствор для разведения конъюгата;

ПР (концентрат х 25) - промывочный раствор;

СБ - субстратный буферный раствор;

ТМБ – хромоген – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, жидкий;

Стоп-реагент – водный раствор серной кислоты 0,75 моль/л.

Набор рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора.

Описание реагентов набора:

Иммуносорбент – разборный 96-луночный полистироловый планшет с прозрачными бесцветными лунками с сорбированной смесью рекомбинантного антигена - аналога главного белка наружной мембраны *Chlamydia trachomatis* (MOMP) и синтетического пептида E-78;

Конъюгат (концентрат х 21) – прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость;

К+ (контрольный положительный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость;

К- (контрольный отрицательный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая зелёного цвета жидкость;

БР – прозрачная сине-фиолетового цвета жидкость, допустимо образование осадка;

РРК – прозрачная или слегка опалесцирующая жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка;

ПР (концентрат х 25) - прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-желтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании;

СБ - прозрачная бесцветная жидкость;

ТМБ - прозрачная бесцветная жидкость;

Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость.

Назначение

Набор предназначен для выявления видоспецифических антител класса А к *Chlamydia trachomatis* в сыворотке (плазме) крови человека и определения их титра.

Меры безопасности

Для изготовления контрольных образцов набора использованы термоинактивированные сыворотки. При работе с набором в лаборатории с исследуемыми образцами сывороток (плазмы) крови человека обращаться, как с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, в спецодежде, не пипетировать ртом. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к пипеткам, флаконы из-под реагентов, лабораторную посуду и т.д.) обеззараживать погружением в 6% раствор перекиси водорода с 0,5% синтетического моющего средства (СМС) или в 3% раствор хлорамина Б, или иного разрешенного к применению дез.средства. Длительность дезактивации – не менее 1 ч. Твёрдые отходы можно обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кГс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывные воды) обезвреживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кГс/см² (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.

Способ применения

Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока их годности!

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при температуре от 18 до 24 °С. Внимание! Иммуносорбент необходимо выдержать в закрытом пакете во избежание конденсации влаги в лунках планшета.

Все растворы необходимо отбирать новыми одноразовыми наконечниками, не допускать касания жидкости в наконечнике краем дозатора!

Для отбора проб использовать калиброванные пипетки переменного объема (одно- и многоканальные) с погрешностью измерения не более 5%.

Посуду для работы с субстратной смесью (ванночки, флаконы и т.д.) перед использованием рекомендуется промыть водой дистиллированной, в случае повторного использования необходимо сразу после работы промыть 70% раствором этилового спирта, а затем водой дистиллированной.

1. Перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых для постановки ИФА.

1. Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длинах волн 450 нм и 620-680 нм.

2. Пипетки переменного объема (одно- и многоканальные).
3. Наконечники одноразовые для пипеток переменного объема.
4. Термостат.
5. Устройство для промывания планшетов (вошер).
6. Вода дистиллированная.
7. Бумага фильтровальная лабораторная.
8. Перчатки медицинские.

2. Приготовление рабочих растворов.

Объёмы реагентов для проведения анализа на необходимом количестве стрипов или лунок на целом планшете приведены в таблице 1.

Таблица 1

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов при постановке ИФА

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор (ПР)		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц. х 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. х 21) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
1	4,0	96,0	0,05	1,0	0,1	1,0
2	8,0	192,0	0,10	2,0	0,2	2,0
3	12,0	288,0	0,15	3,0	0,3	3,0
4	16,0	384,0	0,20	4,0	0,4	4,0
5	20,0	480,0	0,25	5,0	0,5	5,0
6	24,0	576,0	0,30	6,0	0,6	6,0
7	28,0	672,0	0,35	7,0	0,7	7,0

8	32,0	768,0	0,40	8,0	0,8	8,0
9	36,0	864,0	0,45	9,0	0,9	9,0
10	40,0	960,0	0,50	10,0	1,0	10,0
11	44,0	1056,0	0,55	11,0	1,1	11,0
12	50,0	1200,0	0,65	13,0	1,2	12,0

ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимое количество концентрата промывочного раствора отобрать в отдельную ёмкость и добавить соответствующее количество воды дистиллированной (согласно табл. 1). Полученный раствор тщательно перемешать.

Хранение: рабочий промывочный раствор хранить не более 3-х сут при температуре от 2 до 8 °С.

К+ - контрольный положительный образец, готов к применению.

К- - контрольный отрицательный образец, готов к применению.

БР - блок-раствор для рабочего разведения исследуемых образцов, готов к применению. Перед использованием БР тщательно перемешать.

РРК - раствор для разведения конъюгата, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

Конъюгат - рабочий раствор, готовить перед использованием. Необходимое количество РРК перенести в отдельную чистую емкость, добавить соответствующее количество тщательно перемешанного концентрата конъюгата (согласно табл. 1) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!).

Хранение: рабочий раствор конъюгата стабилен не более 12 ч при хранении в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

ТМБ - хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин для приготовления субстратной смеси, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

СБ - субстратный буферный раствор для приготовления субстратной смеси, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

СС - субстратная смесь, готовить перед использованием. Необходимое количество СБ перенести в чистую емкость и добавить соответствующее количество ТМБ (согласно табл. 1). Тщательно перемешать до полного растворения.

Хранение: допустимо хранение СС не более 10 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в химически чистых флаконах.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

Стоп - реагент - готов к применению.

Хранение: после вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными реагенты набора (ПР (концентрат х 25), конъюгат (концентрат х 21), К-, К+, РРК, БР, СБ, ТМБ, стоп-реагент) хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

3. Подготовка исследуемых образцов.

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинаktivированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 72-х ч. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Образцы с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией могут дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

4. Проведение ИФА.

4.1. Вскрыть фольгированный пакет с иммуносорбентом, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов. Пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

4.2. Перед использованием иммуносорбент промыть 2 раза ПР, осторожно заливая его с помощью вошера или многоканальной пипетки до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек и удалить промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала.

4.3. При внесении контрольных образцов в зависимости от количества используемых стрипов рекомендуется следующая схема:

- 1 стрип - 1 лунка К+, 1 лунка К-;
- 2 стрипа - 1 лунка К+, 2 лунки К-;
- 3 стрипа и более - 2 лунки К+, 2 лунки К-.

Например, при постановке ИФА на двух стрипах: в лунку стрипа А-1 пипеткой переменного объема внести 100 мкл К+, в 2 лунки В-1 и С-1 - по 100 мкл К-. В остальные лунки внести по 90 мкл БР и по 10 мкл образцов исследуемых сывороток (разведение сывороток в лунках – 1:10). Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным пипетированием, при этом фиолетово-синий цвет должен измениться на голубовато-зеленый. Если изменения цвета не произошло, то результат анализа может быть ложным или сыворотка не внесена. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате 30 мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

4.4. Содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 4 раза ПР, как в п.4.2.

4.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата в рабочем разведении. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

4.6. Содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 5 раз ПР, как в п. 4.2.

4.7. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл СС и выдержать планшет 10 мин при температуре от 18 до 24 $^\circ\text{C}$ в защищённом от света месте.

4.8. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и провести учет результатов.

5. Учет результатов.

Учет результатов провести спектрофотометрически при двух длинах волн - 450 нм и при референс-длине волны в диапазоне от 620 до 680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учёт результатов при одной длине волны – 450 нм. Реакцию учитывать, если значение оптической плотности (ОП) в лунках с K^+ - не менее 0,8, среднее значение ОП K^- - не более 0,2.

Величину ОП критическая (ОП крит.). рассчитывать по формуле:

$$\text{ОП крит.} = \text{ср. знач. ОП К-} + \text{А},$$

где **А** - коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе, величину которого указывают в рабочей инструкции и паспорте на серию данного препарата*.

Положительным считать образец со значением ОП, равным или превышающим ОПкрит.

Отрицательным считать образец со значением ОП менее ОПкрит.

* «Для набора серии № 089XXX величина $\text{A}=0,220$ ».

6. Определение титра антител.

Возможен полуколичественный учет результатов путем определения титра антител класса А к *Chlamydia trachomatis*. За титр антител принимают максимальное разведение сыворотки, дающее положительный результат.

Титр антител класса А к *Chlamydia trachomatis* определяется по таблице соответствия величины коэффициента позитивности образца (КП) титру антихламидийных антител. Коэффициент позитивности рассчитывается по следующей формуле:

$$\text{КП} = \text{ОП образца} / \text{ОПкрит.}$$

Если значение коэффициента позитивности превышает 12, образец необходимо развести в 4 раза блок-раствором и исследовать повторно. При определении окончательного титра необходимо учитывать дополнительное разведение образца.

Примечание: допустимая погрешность определения титра по таблице соответствия составляет ± 1 титр.

Соответствие коэффициента позитивности и титра анти-Хламидия-IgA

Значение коэффициента позитивности	Титр сыворотки
От 1 до 2,5	1/10
От 2,6 до 5,0	1/20
От 5,1 до 8,0	1/40
От 8,1 до 11,9	1/80
$\geq 12,0$	$\geq 1/160$

Форма выпуска

Иммуносорбент	1 шт.
Конъюгат (концентрат х 21)	0,75 мл – 1 фл.
K+, инаktivированный	1,5 мл – 1 фл.
K-, инаktivированный	3,0 мл – 1 фл.
БР	12,5 мл – 1 фл.
РРК	13,5 мл – 1 фл.
ПР (концентрат х 25)	50,0 мл – 1 фл.
СБ	15,0 мл – 1 фл.
ТМБ	1,5 мл – 1 фл.
Стоп-реагент	25,0 мл – 1 фл.

Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают инструкцию по применению. Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетами или защитная пленка для ИФА планшетов – 1 шт;
- одноразовые наконечники – 16 шт;
- пластиковая ванночка для жидких реагентов – 2 шт;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом – 1 шт.

Срок годности. Условия транспортирования и хранения.

Срок годности набора – 12 мес.

По истечении срока годности набор использованию не подлежит.

Транспортирование наборов должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

Набор должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Условие отпуска - для диагностики «in vitro». Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, Нижний Новгород, ул. Яблонева, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.ru; www.npods.ru.

Дополнительная информация в соответствии с ГОСТ Р 51088-2013

- «Набор предназначен для профессионального использования в клинической лабораторной диагностике специально обученным персоналом. При работе с набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования к безопасности»».

- «Реагенты набора не содержат вредных веществ в опасных концентрациях, за исключением реагентов, обозначенных символом «Внимание». При попадании на кожу или слизистые немедленно промыть большим количеством воды».

- Расшифровка символов по ГОСТ Р 15223-1-2014 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Общие требования».



– Изготовитель, символ 5.1.1;



– Дата изготовления (YYYY-MM), символ 5.1.3;



– Срок годности (дата истечения срока годности в формате YYYY-MM-DD), символ 5.1.4;



– Код партии (номер серии), символ 5.1.5;



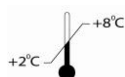
– Номер по каталогу, символ 5.1.6;



– Не допускать воздействия солнечного света, символ 5.3.2;



– Беречь от влаги, символ 5.3.4;



– Температурный диапазон, символ 5.3.7;



– Обратитесь к инструкции по применению, символ 5.4.3;



– Внимание, символ 5.4.4;



– Медицинское изделие для диагностики *in vitro*, символ 5.5.1;



– Содержимого достаточно для проведения *n*-количества тестов (количество определений), символ 5.5.5.