

Копия верна

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 24.06.2008 г. № 4848-П/08



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2007 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов

класса G к белку теплового шока

(HSP60) *Chlamydia trachomatis*

«ХламиБест сHSP60 – 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 экстрапорального оплодотворения.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 (12x8) анализов, включая контроли (по 3 лунки используют для постановки контролей).

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 которого 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 ре-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и зав. лабораторией бактериальных инфекций С.А. Кротовым

10

жиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм. Интенсивность жёлтого окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце иммуноглобулинов класса G к HSP60 *C. trachomatis*.

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

2.2. Состав набора

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

- планшет с иммобилизованным рекомбинантным антигеном HSP60 *C. trachomatis* – 1 шт.;
- K^+ , положительный контрольный образец, инактивированный – лиофилизированная сыворотка крови человека, содержащая иммуноглобулины класса G к антигену HSP60 *C. trachomatis* – аморфная масса белого или светло-желтого цвета, гигроскопична – 1 фл.;
- K^- , отрицательный контрольный образец, инактивированный – лиофилизированная сыворотка крови человека, не содержащая иммуноглобулины класса G к антигену HSP60 *C. trachomatis* – аморфная масса белого или желтого цвета, гигроскопична – 1 фл.;
- конъюгат – антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена, лиофилизированный – аморфная масса белого или желтого цвета, гигроскопична – 1 фл.;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 3,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – прозрачная жидкость зелёного цвета – 1 фл., 13,0 мл;
- разводящий буфер для сывороток (РБС) – жидкость красного цвета – 1 фл., 13,0 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при нагревании – 1 фл., 28,0 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 13,0 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 1,5 мл;

– стоп-реагент – раствор серной кислоты, 1 моль/л – прозрачная бесцветная жидкость – 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 IgG к HSP60 *C. trachomatis* должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия, включающей образцы сывороток, содержащие и не содержащие IgG к HSP60 *C. trachomatis* (рег. № 05-2-187 от 01.06.07). Чувствительность и специфичность по IgG к HSP60 *C. trachomatis* – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При подготовке к проведению анализа следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы подвергать обработке 6 % раствором перекиси водорода (не менее 6 ч).

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;

холодильник бытовой;

пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);

пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы 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 100 мл;

цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

вода очищенная;

6% раствор перекиси водорода.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для внесения образцов в лунки стрипов следует использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°C не более 5 суток, либо при минус (20±3)°C, если необходимо более длительное хранение.

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

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. 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) °C.

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

Контрольные образцы, концентрированный раствор конъюгата должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами хранить при (2-8) °C, использовать в течение 1 мес.

Растворы ТМБ и конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Исключить воздействие света на раствор ТМБ.

При промывке лунки планшета заполнять полностью (300-400 мкл промывочного раствора в зависимости от типа планшета) и не касаться лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

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, СБР, ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Перекисью водорода (другие дезинфицирующие растворы не использовать) обрабатывать только наконечники для пипеток, используемые для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами. В случае их повторного использования, обеззараживать в 6% перекиси водорода (не менее 6 ч) с последующей 10-кратной промывкой в проточной воде, 3-кратной промывкой в дистиллированной воде и кипячением (40 мин) в последней из 3-х порций дистиллированной воды, чтобы избавиться от следов перекиси.

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с остальными реагентами, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента. В случае повторного использования посуду (ванночки) наконечники для пипеток промыть проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с ТМБ, в случае повторного использования, 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.

7.2. Приготовление реагентов.

Перед проведением анализа реагенты набора, в том числе пакет с планшетом, а также исследуемые образцы сыворотки (плазмы) выдержать при комнатной температуре (18-25 °С) не менее 30 мин.

7.2.1. Стрипы

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку планшета необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы поместить вновь в пакет с осушителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранение: при (2-8) °С до 1 мес.

7.2.2. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При наличии осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов в чистую емкость отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см. таблицу), развести дистиллированной водой до указанного в таблице объема и тщательно перемешать.

Хранение: при (2-8) °С до 72 ч.

7.2.3. Контрольные образцы

Растворить лиофилизированные контрольные образцы добавлением во флакон с K^+ – 0,3 мл РПР, а во флакон с K^- – 0,5 мл РПР. Тщательно перемешать.

Хранение: при (2-8) °С до 1 мес.

7.2.4. Раствор конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток.

Приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – при (2-8) °С до 1 мес.

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

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

7.2.5. Раствор ТМБ в рабочем разведении

Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, прилагаемой к набору, непосредственно перед использованием! Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином.

В ванночку для реагентов отобрать необходимое количество концентрата ТМБ в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу), добавить соответствующее количество СБР, тщательно перемешать.

Хранение: Раствор стабилен до 3 ч в защищенном от света месте при (18-25) °С.

7.3. Проведение анализа

Внимание! Промывочный раствор, контрольные образцы и концентрированный раствор конъюгата должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до постановки ИФА и выдержаны при температуре (18-25) °С.

7.3.1. Планшет промыть один раз промывочным раствором, заливая в каждую лунку по 300 мкл промывочного раствора. По истечении 5 мин раствор аккуратно удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор												
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
Раствор конъюгата в рабочем разведении												
Концентрированный раствор конъюгата, мкл	α^*	$2 \times \alpha$	$3 \times \alpha$	$4 \times \alpha$	$5 \times \alpha$	$6 \times \alpha$	$7 \times \alpha$	$8 \times \alpha$	$9 \times \alpha$	$10 \times \alpha$	$11 \times \alpha$	$12 \times \alpha$
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 в рабочем разведении												
ТМБ, концентрат, мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
СБР, 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

$\alpha^* = \text{_____}$ мкл

7.3.2. Во все лунки планшета внести по 80 мкл разводящего буфера для сывороток. В любые две лунки внести по 20 мкл подготовленного (п. 7.2.3) контрольного отрицательного образца (K^-), в одну лунку – 20 мкл подготовленного (п. 7.2.3) контрольного положительного образца (K^+), во все остальные лунки внести по 20 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы), получая таким образом, разведение 1:5. Внесение образцов должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).

7.3.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при (37 ± 1) °С.

7.3.4. За 5-10 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.4). По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть планшет 5 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

Внимание! Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (300-400 мкл рабочего промывочного раствора в зависимости от типа планшета). Необходи-

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

7.3.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 30 мин при $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

7.3.6. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором (6% раствор перекиси водорода) и промыть 5 раз промывочным раствором, удалить влагу как описано выше.

7.3.7. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении (п. 7.2.5).

Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ.

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

Планшет поместить на 30 мин в защищенное от света место при температуре $(18-25) ^\circ\text{C}$.

7.3.8. Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин 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 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– среднее значение ОП в лунках с K^- не более 0,25,

– значение ОП в лунках с K^+ не менее 0,6.

Критическое значение оптической плотности рассчитать по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}}(\text{K}^-) + 0,2.$$

Исследуемую сыворотку расценивать как положительную, если соответствующее ей значение $\text{ОП}_{\text{обр}} \geq \text{ОП}_{\text{крит}} + 0,05$.

Исследуемую сыворотку расценивать как отрицательную, если соответствующее ей значение $ОП_{обр} \leq ОП_{крит} - 0,05$.

Результат считается сомнительным, если $ОП_{крит} - 0,05 < ОП < ОП_{крит} + 0,05$.

10. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. 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 от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 9 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора обращаться:

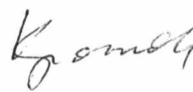
в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу: 630559, п. Кольцово, Новосибирской обл, Новосибирского района, а/я 121, тел. (383) 336-92-49, 227-60-30, 227-67-64, тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44, 336-73-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495) 120-60-95; 120-60-96.

Зав. лаб. бактериальных инфекций

ЗАО «Вектор-Бест»

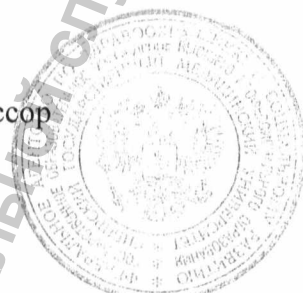


С.А. Кротов

Проректор по НР и ПП

ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава

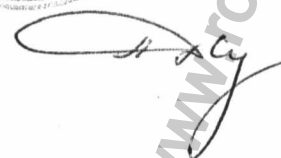
член-корреспондента РАМН, профессор




Л.М. Огородова

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

