

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный государственный  
санитарный врач  
Российской Федерации

  
\_\_\_\_\_

«21»

2009 г.

№

01-11/14

## 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* (MOMP) и синтетического пептида E-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* (МОМР) и синтетического пептида E-78;

Конъюгат (концентрат x 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 x 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. Твёрдые 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/см<sup>2</sup> (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывные воды) обезвреживать добавлением сухого хлорамина Б из расчёта 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/см<sup>2</sup> (0,15 МПа) и 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.

Объемы реагентов для проведения анализа на необходимом количестве стрипов или 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. x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. x 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 и 2). 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 2) 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 и 2). 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 термоинактивированию, 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  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ .

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 °С в защищённом от света месте.

4.8. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента 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 К+ - не менее 0,8, среднее значение ОП К- - не более 0,2.

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

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

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 ОП крит.

Отрицательным считать образец со значением ОП менее ОП крит.

\* « Для набора серии № \_\_\_\_\_ величина А \_\_\_\_\_ ».

#### 6. Определение титра антител.

Возможен полуколичественный учёт 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:  $\text{КП} = \text{ОП образца} / \text{ОП крит.}$

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  $\pm 1$  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 x 21)	0,75 мл – 1 фл.
К+, инактивированный	1,5 мл – 1 фл.
К-, инактивированный	3,0 мл - 1 фл.
БР	12,5 мл – 1 фл.
РРК	13,5 мл – 1 фл.
ПР (концентрат x 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 ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу 119002, Россия, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел.: (499) 241-39-22, факс: (499) 241-92-38 и 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, 8-800-555-0300.

E-mail: [info@npods.nnov.ru](mailto:info@npods.nnov.ru); [www.npods.ru](http://www.npods.ru).

**Директор по производству ООО  
«Научно-производственное объединение  
«Диагностические системы»**

