



Vitrotest[®]

Vitrotest Chlamydia-IgM

Імуноферментна тест-система для якісного визначення антитіл класу IgM до *Chlamydia trachomatis*

Інструкція з використання

1. Призначення
2. Клінічне значення
3. Принцип аналізу
4. Матеріали та обладнання
5. Застереження та техніка безпеки
6. Зберігання та стабільність
7. Підготовка зразків
8. Підготовка реагентів
9. Процедура аналізу
10. Облік результатів та їх інтерпретація
11. Діагностичні характеристики тесту
12. Обмеження аналізу

Література

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK036

«Vitrotest Chlamydia-IgM»
Імуноферментна тест-система для якісного визначення
антитіл класу IgM до *Chlamydia trachomatis*

1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest Chlamydia-IgM» призначена для якісного визначення антитіл класу IgM до *Chlamydia trachomatis* у сироватці чи плазмі крові людини.

Тест-набір може бути застосований, як для проведення ІФА з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

2. Клінічне значення

Серологічні методи діагностики хламідійної інфекції (в тому числі й імуноферментний аналіз, ІФА) дозволяють визначити стадію та характер перебігу хвороби, що особливо важливо при хронічному перебігу захворювання протягом багатьох місяців та років. З цією метою в імуноферментному аналізі визначають специфічні антитіла класів IgM, IgA та IgG, що поступово синтезуються та накопичуються в сироватці крові та в біологічних секретах людини.

Першими від моменту інфікування в крові з'являються специфічні до *Chlamydia trachomatis* антитіла класу IgM – у перші тижні з моменту інфікування. Антитіла цього класу є показником первинної інфекції *Chlamydia trachomatis*. Специфічні до *Chlamydia trachomatis* антитіла класу IgA присутні як в сироватковій, так і в секреторній формах – це показник як гострої інфекції, так і маніфестації при хронічній формі захворювання. В сироватці крові антитіла класу IgA з'являються через 10-14 днів після початку захворювання, трохи раніше, ніж антитіла класу IgG, але у нижчих концентраціях. Їх можна виявляти на початку хвороби в виділеннях із статевих органів. Високі концентрації антитіл цього класу можуть свідчити про хронічну інфекцію. Специфічні IgA антитіла мають період напіврозпаду 5-7 днів, що дозволяє використовувати їх для контролю за ефективністю лікування. Зниження рівня цих антитіл у 2-3 рази свідчить про успішно проведеному терапію.

Антитіла класу IgG з'являються починаючи з третього тижня після початку захворювання. Їх наявність відображає загальну картину імунної відповіді внаслідок гострої, хронічної або перенесеної інфекції. В останньому випадку IgG можуть виявлятися на низькому рівні протягом багатьох років.

3. Принцип аналізу

Визначення антитіл класу IgM до *Chlamydia trachomatis* в тест-системі «Vitrotest Chlamydia-IgM» ґрунтується на принципі «IgM-захвату» твердофазного імуноферментного аналізу.

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованими в лунках моноклональними антитілами, специфічними до імуноглобулінів класу IgM людини. Під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається захват імуноглобулінів класу IgM моноклональними антитілами на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додається пероксидазний кон'югат рекомбінантного білку, який містить видоспецифічний фрагмент основного білку зовнішньої мембрани хламідій, що зв'язується зі специфічними антитілами класу IgM в складі імунних комплексів на твердій фазі. Незв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імунних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). В результаті реакції розчин в лунках, де утворились імунні комплекси забарвлюється в синій колір. Реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту, при цьому синій колір забарвлених лунок змінюється на жовтий. Результат аналізу визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620 нм.

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

ІФА-планшет – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок), з іммобілізованими моноклональними антитілами, специфічними до імуноглобулінів класу IgM людини.

Позитивний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,3 мл розчину імуноглобулінів класу IgM людини зшитих з моноклональними антитілами, специфічними до пероксидази хрому (рожевий).

Негативний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,5 мл негативної сироватки крові людини (жовтий).

Розчин для розведення сироваток РРС – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину з екстрактом молока, детергентом та консервантами (фіолетовий).

Розчин для розведення кон'югату РПК – 1 флакон, що містить 14 мл буферного розчину з екстрактом молока, детергентом та консервантами (жовтий).

Кон'югат (11х) – 1 мікропробірка, що містить 1,4 мл 11-ти кратного концентрату кон'югату рекомбінантного білку *Chlamydia trachomatis* з пероксидазою хрому у буферному розчині зі стабілізаторами (синій).

Розчин ТМБ – 1 флакон, що містить 12 мл розчину ТМБ і перекису водню з стабілізатором та консервантом (безбарвний).

Розчин для промивання Tw20 (20х) – 1 флакон, що містить 50 мл 20-ти кратного концентрату фосфатного буферу з Tween 20 (безбарвний).

Стоп-реагент – 1 флакон, що містить 12 мл розчину 0,5 М сірчаної кислоти (безбарвний).

Клейка плівка – 2 аркуша плівки для заклеювання планшетів під час інкубації.

Бланк внесення проб – 1 аркуш для запису схеми внесення зразків.

Інструкція – 1 екземпляр інструкції з використання.

4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

Для постановки аналізу необхідні такі додаткові реактиви, матеріали та обладнання:

- деіонізована або дистильована вода;
- фільтрувальний папір;
- мірні циліндри на 10, 200 та 1000 мл;
- одноразові рукавички;
- розчин перекису водню 6%;
- одноразовий або чистий посуд для приготування реактивів (флакони та ванночки);
- таймер;
- одно- та багатоканальні автоматичні піпетки змінного об'єму на 20, 200 та 1000 мкл та наконечники до них;
- термостат на 37°C;
- контейнер для твердих відходів;
- контейнер для рідких відходів;
- ¹автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- ²одно- або багатоканальний спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 нм.

^{1,2} *Будь ласка, проконсультуйтеся з нами щодо адаптації Вашого обладнання.*

5. Застереження та техніка безпеки

5.1. Застереження:

– не використовуйте компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;
– не використовуйте під час аналізу та не змішуйте компоненти різних серій та компоненти із тест-систем різних нозологій;

– не використовуйте реактиви інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest™;

Примітка: Розчин для промивання Tw20 (20x), Розчин ТМБ та Стоп-реагент допускається використовувати інших серій, які відрізняються від тих, що вкладені до тест-набору. Ці реактиви використовуються в інших тест-системах виробництва ТОВ „ІВК „Рамінтек”. Будь ласка, проконсультуйтеся з нами для отримання детальної інформації.

- після використання реагенту закривайте кожен флакон своєю кришкою;
- чітко дотримуйтесь режиму промивання планшетів, вказаного в пунктах інструкції;
- під час промивання контролюйте наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;
- кожного разу використовуйте новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;
- уникайте потрапляння прямих сонячних променів на реактиви тест-системи;
- розчин ТМБ має бути безбарвним або світло блакитним перед використанням, якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникайте контакту розчину ТМБ з металами або іонами металів. Для роботи використовуйте лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;
- для приготування розчину ТМБ та внесення в лунки планшета ТМБ-субстрату використовуйте лише нові наконечники, що не були у використанні;
- ні в якому разі не використовуйте один й той же посуд для розчину кон'югату та хромогену.

5.2. Техніка безпеки:

- всі реактиви набору призначені лише для in vitro діагностики;
- постановку аналізу проводити лише у гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- контролі тест-системи «Vitrotest Chlamydia-IgM» протестовано та знайдено негативними на HBsAg, а також на антитіла до ВІЛ 1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однак працювати із контролями та досліджуваними сироватками слід як із потенційно інфекційним матеріалом;
- рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6% упродовж 3 годин при кімнатній температурі, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5% протягом 30 хвилин, або іншими дезінфікуючими агентами;
- тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування при 121°C упродовж 1 години;
- не автоклавуйте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;
- слід уникати розбризкування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту із слизовими оболонками та шкірою;
- у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоту, наприклад, сироваток, обробити поверхню 6%-м перекисом водню, а потім витерти насухо фільтрувальним папером.

6. Зберігання та стабільність

Реагенти тест-системи стабільні протягом строку придатності вказаного на етикетці, якщо їх зберігати при 2-8°C.

Транспортувати набір при температурі 2-8°C. Допускається одноразове транспортування при температурі не вище 20°C протягом двох діб.

7. Підготовка зразків

Зразки сироватки чи плазми крові можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 3 діб після забору. Допускається більш тривале зберігання зразків замороженими при температурі від -20 до -70°C. Заморожені зразки перед використанням розморожують та витримують при кімнатній температурі упродовж 30 хвилин. Після розморожування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникайте повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільняються від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./хв. протягом 10-15 хвилин. Не використовуйте зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

8. Підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest Chlamydia-IgM» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.

8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та **зберігайте щільно закритим на замок (zip-lock)** при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Розчин для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

8.3. Розчин кон'югату

Робоче розведення кон'югату готується наступним чином:

Розведіть концентрат кон'югату 11х (синій) у чистому флаконі розчином для розведення кон'югату (жовтий) у співвідношенні 1:11 (тобто, 1+10), розчин забарвлюється у зелений колір. Наприклад, для 8 лунок аналізу достатньо додати до 1 мл розчину для розведення кон'югату 100 мкл концентрату кон'югату.

Розчин кон'югату в робочому розведенні стабільний протягом доби за умови зберігання при 2-8°C.

9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.2.

9.4. Внести в усі лунки планшета по 90 мкл розчину для розведення сироваток.

9.5. Внести в лунки контролі та досліджувані зразки в наступному порядку: в лунку А1 – 10 мкл позитивного контролю, в лунки В1, С1 та D1 – по 10 мкл негативного контролю, в решту лунок – по 10 мкл досліджуваних сироваток. Під час внесення сироваток та контролів обережно піпетуйте суміш – відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з фіолетового на синій.

9.6. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при температурі 37°C.

9.7. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.8. Приготувати розчин кон'югату згідно пункту 8.3.

9.9. В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин **при кімнатній температурі 18-25°C**.

9.10. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті 9.7.

9.11. «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником. Обережно відібрати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 мкл розчину ТМБ в лунки.

9.12. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25°C.

9.13. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

9.14. Виміряти на рідері оптичну густину в кожній лунці стрипів в двохвильовому режимі при 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

10. Облік результатів та їх інтерпретація

10.1. Достовірність результатів аналізу.

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$ОГ K_{-середнє} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3})/3.$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

– оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 1,5 оптичних одиниць (ОО),

– ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,15 ОО.

– ОГ кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$ОГ K_{-середнє} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{-середнє} \times 2,0.$$

Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення K- за рештою значень негативного контролю.

10.2. Облік результатів аналізу

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,3, тобто

$$Граничне значення = ОГ K_{-середнє} + 0,3.$$

Для кожного досліджуваного зразка розрахувати індекс позитивності (ІП)

$$ІП = \frac{ОГ досліджуваного зразка}{Граничне значення}.$$

10.3. Інтерпретація результатів

Досліджувані зразки із значенням ІП **вище 1,1** вважати **позитивними** (ІП > 1,1).

Зразки із значенням ІП **нижче 0,9** вважати **негативними** (ІП < 0,9).

Зразки із значенням ІП **в межах 0,9-1,1** вважати **невизначеними** (0,9 ≤ ІП ≤ 1,1). Такі сироватки рекомендується дослідити повторно в двох лунках тест-системи. Якщо результати знову будуть в межах невизначених слід провести тестування сироватки, отриманої через 2-4 тижні. В разі одержання невизначених результатів вважати, що сироватка не містить специфічних до *Chlamydia trachomatis* антитіл відповідного класу.

Інтерпретація результатів визначення антитіл класів IgG, IgA та IgM, специфічних до *Chlamydia trachomatis*

Наявність антитіл до <i>Chlamydia trachomatis</i>			Інтерпретація результату
IgG	IgA	IgM	
Відсутні	Відсутні	Відсутні	Зразок не містить специфічних антитіл, або їх концентрація нижче межі чутливості аналізу
Відсутні	Виявляються	Виявляються	Ймовірна рання стадія інфекції
Виявляються	Відсутні	Відсутні	Ймовірна перенесена інфекція
Виявляються	Виявляються	Виявляються	Гостра інфекція
Виявляються	Виявляються	Відсутні	Гостра або хронічна інфекція

11. Діагностичні характеристики тесту

11.1. Специфічність та чутливість

Діагностичні характеристики тест-системи «Vitrotest Chlamydia-IgM» перевіряли на зразках сироваток крові пацієнтів з ознаками гострого уrogenітального хламідіозу, в усіх зразках було виявлено специфічні до *Chlamydia trachomatis* антитіла класу IgA, у 47 % із них виявлялись антитіла класу IgM до *Chlamydia trachomatis*. При дослідженні специфічності набору «Vitrotest Chlamydia-IgM» з використанням 94 сироваток, негативних на антитіла до *Chlamydia trachomatis* всі 94 зразки були виявлені негативними.

11.2. Точність

Відтворюваність результатів в межах однієї постановки аналізу (Intra assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали в 32 повторях на двох серіях тест-систем.

№ сироватки	ІП	CV ₁ , %	CV ₂ , %
1293	2,35	4,4	4,2
1215	6,92	4,9	3,2

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали протягом трьох днів в трьох постановках аналізу по 8 повторів в кожному аналізі.

№ сироватки	ІП	CV, %
1293	2,3	6,1
1215	7,1	5,1

12. Обмеження аналізу

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest Chlamydia-IgM» є свідченням наявності у пацієнта антитіл класу IgM, специфічних до *Chlamydia trachomatis*, які продукуються організмом при інфікуванні збудником уrogenітального хламідіозу.

Слід зауважити, що у випадку ранньої хламідійної інфекції результат ІФА може бути негативний через відсутність антитіл на початковому етапі хвороби. При наявності клінічних проявів захворювання рекомендується провести повторне тестування не менш ніж через два тижня. Двох-трьох-кратне підвищення рівня антитіл свідчить про активність інфекційного процесу.

Для постановки діагнозу слід враховувати як результати лабораторних досліджень, так і клінічні прояви захворювання.

Література

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 trachomatis* 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 trachomatis* infection // In "Clinical Microbiology Reviews". – 1997. – P. 160-184.

Умовні позначення

Інтерпретація умовних символів:

	«Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i> »
	«Код партії»
	«Номер за каталогом»
	«Дата виготовлення»
	«Використати до»
	«Температурне обмеження»
	«Містить достатньо для (n-) випробувань»
	«Берегти від прямих сонячних променів»
	«Увага, дивись інструкцію з використання»
	«Виробник»
	«Ознайомлення з інструкціями для застосування»

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



Товариство з обмеженою відповідальністю «Іноваційно-виробнича компанія «Рамінтек»
03039 Україна, м. Київ, пр-т 40-річчя Жовтня, 7, оф. 227 (юридична адреса)
07300 м. Вишгород, Київська обл., вул. Шолуденка, 19 (фактична адреса)
тел. +380 44 222-76-72

Схема проведення аналізу в тест-системі «Vitrotest Chlamydia-IgM»

Витримати реакенти 30 хв. при 18-25°C

Приготувати розчин для промивання планшета, розвести 20х концентрат розчину для промивання *Tw20* очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води

Заповнити бланк внесення проб для аналізу

В лунки планшета внести по 90 мкл розчину для розведення сироваток

Внести по 10 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки:

A1 – позитивний контроль

B1, C1 та D1 – негативний контроль,

E1 та решта лунок – досліджувані зразки

Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з фіолетового на синій

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при температурі 37°C

Промити лунки 5 разів

Розвести концентрат кон'югату (11х) (*синій*) розчином для розведення кон'югату (*жовтий*) 1:11(тобто, 1+10). Наприклад, 1000 мкл розчину + 100 мкл кон'югату (*розчин забарлюється в зелений колір*)

В лунки стрипів внести по 100 мкл розведеного кон'югату

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при кімнатній температурі (18-25°C)

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату

Інкубувати планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі (18-25° C)

В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту

Виміряти оптичну густину в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм

Розрахувати граничне значення (ГЗ) в тест-системі «Vitrotest Chlamydia-IgM» за формулою:

$$ГЗ = ОГ K_{\text{середнє}} + 0,30$$

Розрахувати індекс позитивності (ІП) для досліджуваних зразків: $ІП = \frac{ОГ \text{ досліджуваного зразка}}{\text{граничне значення}}$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці:

Значення ІП	Результат
$ІП_{\text{зразка}} > 1,1$	позитивний
$0,9 \leq ІП_{\text{зразка}} \leq 1,1$	невизначений
$ІП_{\text{зразка}} < 0,9$	негативний
