

ЗМІСТ

1.	ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2.	ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	3
3.	АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4.	СКЛАД НАБОРУ	4
5.	ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	5
6.	ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ	5
7.	ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	5
8.	УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ	6
9.	ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	7
10.	ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ	9
11.	ЛІТЕРАТУРА	9

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ IgM АНТИТІЛ ДО АНТИГЕНІВ *CHLAMYDIA SPP.* В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ «Chlamydia IgM-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «Chlamydia IgM-ІФА» призначений для якісного визначення IgM антитіл проти антигенів *Chlamydia spp.* в сироватці (плазмі) крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

1.2. Серологічні методи діагностики хламідіозу (в тому числі імуноферментний аналіз) дозволяють визначити стадію і характер протікання захворювання, що особливо важливо при хронічному перебігу захворювання протягом багатьох місяців і років. З цією метою в ІФА визначають специфічні антитіла класів IgM, IgA і IgG, які послідовно синтезуються і накопичуються в сироватці крові та в біологічних секретах людини.

1.3. Першими з моменту інфікування в крові з'являються специфічні до *Chlamydia spp.* антитіла класу IgM – в перші тижні з моменту інфікування. Антитіла цього класу є показником первинної інфекції *Chlamydia spp.* Специфічні до *Chlamydia spp.* антитіла класу IgA присутні як в сироватковій, так і в секреторних формах - це показник як гострої інфекції, так і маніфестації при хронічній формі захворювання. У сироватці крові антитіла класу IgA з'являються через 10-14 днів від початку захворювання, трохи раніше антитіл класу IgG, але в менших концентраціях. Їх можна виявляти на початку хвороби у виділеннях зі статевих органів. Високі концентрації антитіл цього класу можуть свідчити про хронічні інфекції. Специфічні IgA антитіла характеризуються періодом напіврозпаду 5-7 днів, що дозволяє використовувати їх для контролю ефективності лікування. Зниження рівня цих антитіл в 2-3 рази свідчить про успішно проведену терапію.

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

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення IgM антитіл проти антигенів *Chlamydia spp.* ґрунтується на використанні «сендвіч»-варіанта твердофазного імуоферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані моноклональні антитіла проти IgM. Антитіла зі зразка зв'язуються з антитілами проти IgM на твердій фазі.

Комплекс, що утворився, специфічно виявляють за допомогою кон'югату *Chlamydia spp.* з пероксидазою хрину. У результаті утворюється зв'язаний із твердою фазою «сендвіч», що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) рідина в лунках відбувається. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації IgM антитіл проти антигенів *Chlamydia spp.* в досліджуваному зразку. Індекс позитивності (ІП, %) IgM антитіл проти антигенів *Chlamydia spp.* в досліджуваних зразках розраховується за формулою, наведеною в Інструкції.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність. Набір реагентів «Chlamydia IgM-ІФА» перевіряли на зразках сироваток крові пацієнтів із ознаками гострого урогенітального хламідіозу, в усіх зразках були виявлені специфічні проти *Chlamydia spp.* антитіла класу IgG, у 82% з них виявлялись антитіла класу IgM проти *Chlamydia spp.*

3.2. Відтворюваність.

Коефіцієнт варіації результатів визначення IgM антитіл проти антигенів *Chlamydia spp.* у тому самому зразку сироватки (плазми) крові з використанням Набору «Chlamydia IgM-ІФА» не перевищує 8.0%.

4. СКЛАД НАБОРУ

	Код компонента	Символ	Найменування	К-сть	Од.	Опис
1	P10iMZ	SORB MTP	Планшет 96-лунковий полістироловий, стрипований, готовий до використання	1	шт.	-
2	CN105MZ CP105MZ	CONTROL- CONTROL+	Контрольні сироватки (негативна і позитивна) на основі сироватки крові людини з відомим вмістом IgM антитіл проти антигенів <i>Chlamydia spp.</i> , готові до використання (0.5 мл и 0.2 мл відповідно)	2	шт.	прозора безбарвна рідина та прозора рідина червоного кольору
3	T105MXZ	CONJ 11X	Концентрат кон'югату , 11х-кратний (1.4 мл)	1	шт.	прозора рідина синього кольору
4	ST105MZ	DIL CONJ	Буфер для розведення концентрату кон'югату , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора рідина яскраво-синього кольору
5	SP105MZ	DIL	Буфер для розведення зразків , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора рідина яскраво-пурпурового кольору
6	R055Z	SUBS TMB	Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
7	S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат відмивочного розчину (сольовий розчин з твін-20 та бензойною кислотою), 26-кратний (22 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
8	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
9	N003	-	Плівка для заклеювання планшета	2	шт.	-
10	K105MI	-	Інструкція з використання Набору реагентів «Chlamydia IgM-ІФА»	1	шт.	-
11	K105MQ	-	Паспорт контролю якості Набору реагентів «Chlamydia IgM-ІФА»	1	шт.	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. Набір реагентів попадає до переліку Б, Додатку 2 Технічного регламенту №754 від 2 жовтня 2013 року.

5.2. Всі компоненти Набору, за винятком стоп-реагенту (5,0% розчин сірчаної кислоти), у концентраціях, що використовуються, є нетоксичними.

Розчин сірчаної кислоти має подразнюючу дію; при роботі з ним потрібно уникати його розбризкування та потрапляння на шкіру і слизові оболонки. При потраплянні на шкіру і слизові оболонки уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.3. При роботі з Набором слід дотримуватись НПАОП 85.14-1.09-81. Правила влаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81).

5.4. Під час роботи з Набором необхідно користуватися одноразовими гумовими або пластиковими рукавичками, оскільки зразки крові людини слід розглядати як потенційно інфікований матеріал, здатний тривалий час зберігати і передавати віруси ВІЛ, гепатиту або будь-який інший збудник вірусної інфекції.

5.5. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густину вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостат, що підтримує температуру $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, що дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 5–250 мкл;
- циліндр мірний об'ємом 1000 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;
- папір фільтрувальний.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Перед проведенням аналізу компоненти Набору і досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати при кімнатній температурі ($+18...+25^{\circ}\text{C}$) не менше 30 хв.

7.2. Підготовка планшета.

Відкрити пакет із планшетом і встановити в рамку необхідну кількість стрипів. Стрипи, що залишилися невикористаними, ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ протягом всього терміну придатності Набору.

7.3. Приготування розчину для відмивання.

Вміст флакона з концентратом відмиваючого розчину (22 мл), перенести в мірний циліндр об'ємом 1000 мл, додати 550 мл дистильованої води та ретельно перемішати. У випадку часткового використання Набору слід відібрати відповідну кількість концентрату розчину для відмивання та розвести дистильованою водою в 26 разів (до 1 мл концентрату розчину для відмивання додати 25 мл дистильованої води).

7.4. Приготування кон'югату.

Приготуйте кон'югат: для цього розведіть концентрат кон'югату в 11 разів буфером для розведення концентрату кон'югату.

УВАГА! Розведений розчин кон'югату не зберігається! Розводьте тільки ту частину концентрату кон'югату, яка необхідна для даної постановки

Наприклад: 100 мкл концентрату кон'югату +1000 мкл буфера для розведення кон'югату.

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «Chlamydia IgM-ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника, при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності, який вказано на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до +25 °C не довше 15 діб. Не допускається заморожування цілого набору набору.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторях 46 досліджуваних зразків та 2 проб контрольних сироваток (всього 96 визначень).

8.3. У випадку часткового використання Набору, компоненти необхідно зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;

- буфер для розведення зразків, концентрат кон'югату, буфер для розведення концентрату кон'югату, субстрат, стоп-реагент після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;

- контрольні сироватки, після відкриття флаконів, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C не довше 2 місяців;

- концентрат розчину для відмивання, що залишився невикористаним, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;

- готовий розчин для відмивання необхідно зберігати при кімнатній температурі (+18...+25°C) не довше 15 діб або при температурі +2...+8°C не довше 45 діб.

Важливе зауваження. Після використання реагенту закривайте флакон кришкою. Закривайте кожний флакон відповідною кришкою.

8.4. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, непрозору сироватку (плазму) крові, а також сироватку (плазму) крові, що містить азид натрію. У разі проведення аналізу не в день взяття крові, сироватку (плазму) слід зберігати при температурі -20°C. Не допускається повторне заморожування/розморожування зразків. Допускається аналіз сироваток, зберігання яких з моменту забору крові здійснювалося при температурі від +2°C до +8°C не довше 7 діб.

8.5. Дослідження зразків сироватки (плазми) крові людей, що отримували з метою діагностики або терапії препарати, до складу яких входять мишачі антитіла, може давати помилкові (підвищені) значення.

8.6. Під час використання Набору для проведення декількох незалежних серій аналізів слід мати на увазі, що для кожного визначення необхідне використання контрольної сироватки.

8.7. Не використовуйте компоненти з інших наборів або з аналогічних наборів інших партій.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стрипів – із розрахунку на кількість досліджуваних зразків в двох повторах та 4 лунки для контрольних сироваток (негативна контрольна сироватка - 3 лунки, позитивна контрольна сироватка -1 лунка).
2	Приготуйте кон'югат: для цього розведіть концентрат кон'югату в 11 разів буфером для розведення концентрату кон'югату. УВАГА ! Розведений розчин кон'югату не зберігається! Розводьте тільки ту частину концентрату кон'югату, яка необхідна для даної постановки. Наприклад: 100 мкл концентрату кон'югату + 1000 мкл буфера для розведення кон'югата.
3	Внесіть в усі лунки планшета по 90 мкл буфера для розведення зразків.
4	Внесіть у відповідні лунки в двох повторах по 10 мкл контрольних сироваток. В лунки, що залишилися, внесіть в двох повторах по 10 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові. Внесення контрольної сироватки та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 15 хвилин.
5	УВАГА! При внесенні зразків сироватки (плазми) крові відбувається зміна забарвлення розчину.
6	Обережно перемішайте вміст планшета круговими рухами на горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 30 хвилин при температурі +37°C.
7	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 3 рази. При кожному відмиванні додавайте в усі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див. п. 7.3), струшуйте планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, а потім видаляйте рідину з лунок за допомогою вакууму або витрушуванням. По закінченні відмивання необхідно ретельно видаляти залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
8	Внесіть у всі лунки по 100 мкл кон'югату.
9	Заклейте планшет плівкою для заклеювання планшетів інкубуйте його протягом 30 хвилин при температурі +18°C..+25°C.
10	По закінченні інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 5 разів.
11	Внесіть у всі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину. Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно здійснити протягом 2-3 хв. Інкубуйте планшет у темряві при кімнатній температурі (+18...+25°C) протягом 10–20 хвилин в залежності від швидкості розвитку синього забарвлення.
12	Внесіть в усі лунки з тією же швидкістю і у тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, по 100 мкл стоп-реагенту; при цьому вміст лунок забарвлюється в яскраво-жовтий колір.

13	Визначте величину оптичної густини (ОГ) в лунках планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання ОГ вмісту лунок планшета необхідно провести протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра виставляйте за повітрям.
14	<p>Розрахуйте вміст IgM антитіл проти антигенів <i>Chlamydia spp.</i> в досліджуваних зразках. Для цього:</p> <p>1. Розрахуйте середнє ОГ Негативної контрольної сироватки: $\text{ОГ (CN105MZ)}_{\text{Ср}} = (\text{ОГ1 (CN105MZ)} + \text{ОГ2 (CN105MZ)} + \text{ОГ3 (CN105MZ)}) / 3;$Результати аналізу вважати достовірними, якщо:</p> <ul style="list-style-type: none">• ОГ Позитивної контрольної сироватки не нижче 1.5 оптичних одиниць (ОО);• ОГ Негативної контрольної сироватки не вище 0.15 ОО в усіх лунках. <p>2. Розрахуйте рівень граничного значення Cut off, для цього до середнього значення ОГ Негативного контролю додайте 0.2</p> $\text{Cut off} = \text{ОГ (CN105MZ)}_{\text{Ср}} + 0.2$ <p>3. Розрахуйте Індекс Позитивності (ІП, %) для кожного досліджуваного зразка, для цього ОГ зразка поділіть на значення Cut off</p> $\text{ІП} = \text{ОГзразка} / \text{Cut off}$

10. ОЧІКУВАННІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ

Ґрунтуючись на результатах досліджень, що проведені фахівцями ТОВ «ХЕМА», рекомендуємо скористатися нормами, наведеними нижче. Разом із тим, у відповідності до принципів GLP (Належної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна самостійно визначити параметри норми, які є характерними для обстежуваної популяції.

Інтерпретація результатів:

При ІП > 1.1 зразок позитивний,

при ІП < 0.9 - негативний.

При значенні ІП, що лежить в діапазоні від 0.91 до 1.09 - результат в граничній зоні (+/-). Такі сироватки рекомендується досліджувати повторно. Якщо повторний отриманий результат буде невизначеним, то слід провести тестування сироватки, отриманої через 2-4 тижні. У разі отримання невизначених результатів такі зразки вважати негативними.

11. ЛІТЕРАТУРА

1. Бочкарев Е.Г. Лабораторная диагностика хламидийной инфекции. – Москва, 2002. – 38 с.
2. Кудрявцева Л.В., Мисюрина О. ., Генерозов .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 spp. 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 spp. infection // In "Clinical Microbiology Reviews". – 1997. – P. 160-184.

З питань якості Набору «**Chlamydia IgM-ІФА**», звертатися в ТОВ «ХЕМА» за адресою:

м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23

тел./факс: + 38 (044) 422-62-16

email: info@xema.com.ua

www. xema-medica.com

Начальник відділу з контролю якості ТОВ «ХЕМА»

Коваленко Еліна Володимирівна

Для нотаток

