

**СОДЕРЖАНИЕ**

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	9
11. ЛИТЕРАТУРА	9

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,  
к. б. н. Д. С. Кострикиным

## **ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgM АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ CHLAMYDIA SPP. В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «Chlamydia IgM-ИФА»**

### **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «Chlamydia IgM-ИФА» предназначен для качественного определения IgM антител к антигенам Chlamydia spp. в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Серологические методы диагностики хламидийной инфекции (в том числе и иммуноферментный анализ, ИФА) позволяют определить стадию и характер протекания заболевания, что особо важно при хроническом течении заболевания на протяжении многих месяцев и лет. С этой целью в ИФА определяют специфические антитела классов IgM, IgA и IgG, которые последовательно синтезируются и накапливаются в сыворотке крови и в биологических секретах человека.

**1.3.** Первыми с момента инфицирования в крови появляются специфические к Chlamydia spp. антитела класса IgM – в первые недели с момента инфицирования. Антитела этого класса являются показателем первичной инфекции Chlamydia spp. Специфические к Chlamydia spp. антитела класса IgA присутствуют как в сывороточной, так и в секреторной формах – это показатель как острой инфекции, так и манифестации при хронической форме заболевания. В сыворотке крови антитела класса IgA появляются через 10–14 дней от начала заболевания, немного раньше антител класса IgG, но в меньших концентрациях. Их можно обнаруживать в начале болезни в выделениях из половых органов. Высокие концентрации антител этого класса могут свидетельствовать о хронической инфекции. Специфические IgA антитела характеризуются периодом полураспада 5–7 дней, что позволяет использовать их для контроля эффективности лечения. Снижение уровня этих антител в 2–3 раза свидетельствует об успешно проведенной терапии.

**1.4.** Антитела класса IgG появляются, начиная с третьей недели от начала заболевания. Их наличие отображает общую картину иммунного ответа в результате острой, хронической или перенесенной инфекции. В последнем случае IgG могут определяться на низком уровне в течение многих лет

## 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgM антител к антигенам *Chlamydia spp.* основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы моноклональные антитела к IgM. Антитела из образца связываются с антителами к IgM на твердой фазе. Образовавшийся комплекс специфически выявляют с помощью конъюгата *Chlamydia spp.* с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgM антител к антигенам *Chlamydia spp.* в исследуемом образце. Индекс позитивности (ИП, %) IgM антител к антигенам *Chlamydia spp.* в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**3.1. Специфичность.** Набор реагентов «*Chlamydia IgM-ИФА*» проверяли на образцах сывороток крови пациентов с признаками острого урогенитального хламидиоза, во всех образцах были выявлены специфические к *Chlamydia spp.* антитела класса IgG, в 82 % из них выявлялись антитела класса IgM к *Chlamydia spp.*

### **3.2. Воспроизводимость.**

Коэффициент вариации результатов определения содержания IgM антител к антигенам *Chlamydia spp.* в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «*Chlamydia IgM-ИФА*» не превышает 8,0 %.

## 4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P105MZ	<b>Планшет</b> 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт	-
2	CN105MZ CP105MZ	<b>Контрольные сыворотки</b> (отрицательный и положительный контроли) на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgM антител к антигенам Chlamydia spp., готовы к использованию (0.5 мл и 0.3 мл соответственно)	2	шт	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
3	T105MXZ	<b>Концентрат коньюгата</b> (1.4 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
4	ST105MZ	<b>Буфер для разведения концентрата коньюгата</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная жидкость желтого цвета
5	SP105M	<b>Буфер для разведения образцов</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
6	R055Z	<b>Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
7	S008Z	<b>Концентрат отмывочного раствора</b> , 21x-кратный (22 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
8	R050Z	<b>Стоп-реагент</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
9	N003	Бумага для заклеивания планшета	2	шт	-
10	K105MI	Инструкция по применению Набора реагентов «Chlamydia IgM-ИФА»	1	шт	-
11	K105MQ	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Chlamydia IgM-ИФА»	1	шт	-

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**5.1.** Потенциальный риск применения Набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

**5.2.** Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0 % раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

**5.3.** При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

**5.4.** При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру +37 °С ±0,1 °С
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 10–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

**7.1.** Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдерживать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин.

### 7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

### 7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

### 7.4. Приготовление конъюгата.

Приготовьте конъюгат: для этого разбавьте концентрат конъюгата в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата. ВНИМАНИЕ! Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата

конъюгата, которая необходима для данной постановки!

Пример: 100 мкл концентрата конъюгата + 1000 мкл буфера для разведения конъюгата.

## **8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

**8.1.** Набор реагентов «Chlamydia IgM-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

**8.2.** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 46 исследуемых образцов и 2 проб контрольных сывороток (всего 96 определений).

**8.3.** В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- Буфер для разведения образцов, концентрат конъюгата, Буфер для разведения концентрата конъюгата, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- Контрольные сыворотки после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

**8.4.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия.

Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

**8.5.** Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

**8.6.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

## 9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов - исследуемые образцы в 2 повторах и 4 лунки для контрольных сывороток (Отрицательный контроль 3 лунки, Положительный контроль 1 лунка)
2	<b>Приготовьте конъюгат:</b> для этого разбавьте концентрат конъюгата в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата. <b>ВНИМАНИЕ!</b> Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки! Пример: 100 мкл концентрата конъюгата + 1000 мкл буфера для разведения конъюгата
3	<b>Внесите во все лунки планшета по 90 мкл буфера для разведения образцов.</b>
4	<b>Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл контрольных сывороток. В остальные лунки внесите в дубликатах по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.</b> Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
5	<b>ВНИМАНИЕ!</b> При внесении образцов сыворотки (плазмы) крови происходит изменение цвета раствора.
6	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. <b>Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.</b>
7	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и <b>отмойте лунки 3 раза.</b> При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
8	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.</b>
9	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и <b>инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +18...+25 °С.</b>
10	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и <b>отмойте лунки 5 раз.</b>
11	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.</b> Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.

12	<p><b>Внесите во все лунки</b> с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидаина, <b>по 100 мкл стоп-реакента</b>, при этом содержащее лунок окрашивается в яркий желтый цвет.</p>
13	<p>Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержащего лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержащего лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реакента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.</p>
14	<p>Рассчитайте содержание IgM антител к антигенам Chlamydia spp. в исследуемых образцах. Для этого:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля:           <math display="block">\text{ОП (CN105MZ)Ср} = (\text{ОП1 (CN105MZ)} + \text{ОП2 (CN105MZ)} + \text{ОП3 (CN105MZ)}) / 3;</math> <p>Результаты анализа считать достоверными, если</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ОП Положительного контроля не ниже 1.5 оптических единиц (ОЕ)</li> <li>• ОП Отрицательного контроля не выше 0.15 ОЕ во всех лунках</li> <li>• ОП каждого значения Отрицательного контроля отличается не более чем в два раза от среднего значения отрицательного контроля, т.е. <math>\text{ОП (CN105MZ)Ср} \times 0.5 &lt; \text{ОПн (CN105MZ)} &lt; \text{ОП (CN105MZ)Ср} \times 2.0</math></li> </ul> <p>если одно из значений Отрицательного контроля выходит за пределы этого интервала, то его значение не участвует в расчете ОП (CN105MZ)Ср</p> </li> <li>2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.2           <math display="block">\text{Cut off} = \text{ОП (CN105MZ)Ср} + 0.2</math> </li> <li>3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off           <math display="block">\text{ИП} = \text{ОПобразца} / \text{Cut off}</math> </li> </ol>



## 10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

### **Интерпретация результатов:**

**При ИП > 1.1 образец положительный,**

**при ИП < 0.9 - отрицательный.**

При значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результат в пограничной зоне (+/-).

Такие сыворотки рекомендуется исследовать повторно. Если повторный полученный результат будет неопределенным, то следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными.

## 11. ЛИТЕРАТУРА

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 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.

По вопросам, касающимся качества Набора «**Chlamydia IgM-ИФА**»,  
следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:

105043, Москва, а/я 58,

тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: [info@xema.ru](mailto:info@xema.ru); [rqc@xema.ru](mailto:rqc@xema.ru)

интернет: [www.xema.ru](http://www.xema.ru); [www.xema-medica.com](http://www.xema-medica.com)

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,

к. б. н. Д. С. Кострикин



