Набор для определения Хламидий IgA

CHLAMYDIA TRACHOMATIS IgA ELISA

Кат. номер **: 139-3461**
Количество **: 96**
Производитель **: DRG (Германия)**

Внимание: *основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.*

Методика от 08-2007

1. Введение

Иммуноферментный анализ для качественного и полуколичественного определения антител класса IgA к антигенам ***Chlamydia trachomatis*** в сыворотке человека.

2. Принцип анализа

Набор **CHLAMYDIA TRACHOMATIS IgA ELISA** это набор для детекции антител класса IgA к вирусу Chlamydia trachomatis в сыворотке человека.

Микротитровальные стрипованные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигенами к вирусу Chlamydia trachomatis. **Разведенные** образцы пациента и **готовые к использованию** контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфичные к вирусу Chlamydia trachomatis антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляется конъюгат антител IgA человека с меткой пероксидазы хрена. Во время второй инкубации этот конъюгат связывается специфически с антителами IgA, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями

После второй промывки (для удаления несвязанного коньюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции.

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител специфичных к вирусу Chlamydia trachomatis. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA - ридере.

3. Предостережения

- **Данный набор предназначен только для диагностики «ин-витро».**
- **Не использовать вместе реагенты или стрипы из разных лотов.**
- **Не использовать вместе реагенты разных производителей.**
- **Не использовать реагенты после окончания срока годности , указанного на этикетке.**
- **Использовать только чистые наконечники для пипеток, пипетки и лабораторный инвентарь.**
- **Не путать колпачки реагентов во избежание кросс-контаминации.**
- **Плотно закрывать флаконы с реагентами сразу после использования.**
- **После первого открывания и последующего хранения проверять флаконы конъюгата и контролей на микробную контаминацию перед дальнейшим использованием.**
- **Во избежание кросс-контаминации и ложно завышенных результатов пипетировать образцы пациентов и раскапывать конъюгат без расплескивания прямо на дно лунок.**
- **Во время инкубации накрывать микротитровальные стрипы пленкой для предотвращения испарения.**

4. Компоненты набора

4.1 Содержимое набора

1. **Chlamydia trachomatis (IgA),** 12x8 микротитровальные лунки с делимых стрипов покрытых антигенами Chlamydia trachomatis; вкл. 1 держатель для стрипов, 2 пленки для накрывания
2. **Раствор для разведения образцов***** 100 мл
   готов к использ., желтого цвета; pH 7.2 ± 0.2.
3. **Chlamydia trachomatis IgA «+» контроль*****2 мл
   готов к использ.,желтого цвета, красный колпачок
4. **Chlamydia trachomatis IgA «-» контроль*****2 мл
   готов к использ., желтого цвета,желтый колпачок
5. **Chlamydia trachomatis IgA «Cut-off» контроль*****2 мл
   готов к использ., желтого цвета, желтый колпачок
6. **Конъюгат Chlamydia trachomatis anti-IgA****20 мл
   готов к использ., красн. цв., бесцв. колп;
   кроличьи anti-human IgA , меченые пероксидазой
7. **ТМВ раствор** 14 мл
   готов к использ., 3,3',5,5'-tetra-methyl-benzidine
8. **Стоп раствор** 14 мл
   готовая к использованию серная кислота., 0.2 Моль/л

Предупреждение:
Серная к-та раздражает глаза и кожу. Хранить в недоступном для детей месте. При контакте с глазами промыть водой и проконсультироваться с врачом!

9. **Промывочный раствор*** 50 мл
   концентрация 20x; 1000 ml; pH 7.2 ± 0.2

***⇒ содержит 0.03 % ProClin 300**
****⇒ содержит 0.3 % ProClin 300+0.01 % гентамицина сульфата**
*****⇒ содержит 0.03 % ProClin 300+0.015 % 5-бромо-5-нытро-1.3-диоксан (BND) + 0.010 % 2-метил-2H-изотиазол-3-один (MIT).**

4.1.1 Необходимые но не поставляемые материалы

1. Микротитровальный планшеточный калибровочный ридер (450/620нм +/- 10нм).
2. Калибровочные микропипетки разного объема.
3. Инкубатор на 37°C.
4. Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
5. Вортексный трубочный миксер.
6. Таймер.
7. Абсорбирующая бумага.

4.2 Стабильность и хранение набора

Реагенты стабильны до даты срока годности, указанной на этикетке при хранении при 2 - 8 °C.
Не использовать реагенты после окончания срока годности!

4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием приведите все реагенты и необходимое количество стрипов к комнатной температуре.

Рабочий промывочный раствор
Развести промывочный раствор **1+19** (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистилированной водой. потребление: **~5 мл** на определение.
Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °C на водяной бане. Стабильность после разведения: 4 недели при 2 ÷ 8 °C.
Микротитровальные стрипы
Стрипы имеют вакуумную упаковку. Сразу после открытия упаковки и удаления стрипов оставшиеся стрипы необходимо запаковать герметично в пластиковую упаковку с влагопоглотителем, поставляемым в наборе и хранить при 2 ÷ 8 °C.

5. Образцы

Развести каждый образец пациента **1+100** раствором для разведения образцов, напр., 10 мкл образца + 1 мл IgG/A раствора для разведения (хорошо смешать).
Примечание: Контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

Внимательно прочьтите инструкцию перед проведением анализа. Надежность результатов зависит от четкого следования инструкциям.

Очень важно довести все компоненты до комнатной температуры перед началом анализа!

Перед проведением анализа необходимо составить схему распределения и идентификации образцов и контролей с помощью формы вложенной в набор.

Отобрать требуемое количество микротитровальных стрипов или лунок и поместить их в держатель.

Разместите по меньшей мере:

1 лунка (напр., A1) для бланка субстрата,
1 лунка (напр., B1) для отрицательного контроля
2 лунки (напр., C1+D1 для cut-off контроля, и
1 лунка (напр., E1) для положительного контроля.

На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.

6.2 Процедура анализа

Этап 1

a) Раскапать:
100 мкл **готового к употр**. отрицательного контроля в лунки B1,
100 мкл **готового к употр**. "cut-off" контроля в лунки C1+D1,
100 мкл **готового к употр.** положительного контроля в лунку E1 и
100 мкл **каждого разведенного** образца пациента в оставшиеся лунки согласно схеме**.** .

Оставить лунку A1 для бланка субстрата! Накрыть лунки пленкой поставляемой в наборе.

b) Инкубировать: **1 час при 37 °C**.
Во время инкубации подготовить требуемое кол-во промывочного раствора достаточное для количества используемых лунок. (см. «Подготовка реагентов»).

c) Удалить содержимое лунок и промыть их **5 раз** 300 мкл рабочего промывочного раствора**.**

Примечание:
Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.

В конце осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!

Этап 2

a) Раскапать:
100 мкл готового к употр. конъюгата антител IgA к Chlamydia trachomatis **во все лунки кроме A1 и накрыть их пленкой**.

b) Инкубировать:
30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °C). Не подвергать воздействию прямого солнечного света!

c) **Повторить процедуру промывки** как описано в этапе 1). **Примечание: осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!**

Этап 3

a) Раскапать:
по 100 мкл готового к употр. раствора ТМБ **во все** лунки и опять их накрыть.

b) Инкубировать: **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ÷ 25 °C) в темноте.**

c) Раскапать:
по 100 мкл стоп-раствора (как и ТМБ) **во все** лунки.

Любое голубое окрашивание проявившееся во время инкубации переходит в желтое.

Примечание: высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!

6.3 Измерение

Настроить микропланшетный ридер для ELISA на нуль используя **бланк субстрата в лунке A1.**

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на нуль используя бланк субстрат в лунке A1, вычитайте значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции. Измерить абсорбцию во всех лунках при 450 нм и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в схему.

***Двойная длина волны – рекомендуется считывать на* 620 нм как референтной длине волны.** Где применимо рассчитать среднее значение абсорбции всех дублей.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Надежность процесса анализа

Постановка анализа может считаться **действительной** при соблюдении следующих условий:

- ***Бланк субстрата* в A1:⇒** значение абсорбции менее **0.100.**
- ***Отриц. контроль в* B1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.200.**
- ***Cut-Off контроль в* C1/D1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.350-0.550.**
- ***Положит. контроль* в E1** должны иметь абсорбцию равную или более значения "**Cut-off**"**.**

7.2 Вычисление

Среднее значение абсорбции "Cut-off" контроля [CO]

Рассчитать среднее значение абсорбции 2 определений негативных контролей (напр., в C1/D1).

Пример: (0.44 + 0.46) ÷ 2 = 0.45 = CO

7.3 Интерпретация

Средние значения абсорбции образцов пациента
более чем на **10 % больше CO**
⇒ **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

(Средние) значения абсорбции пациентов
от 10 % выше до 10 % ниже CO
⇒ **серая зона** ⇒ **повторить анализ**
2 - 4 недели спустя – на новых пробах пациентов

результат второго анализа опять
в «серой зоне»
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

средние значения абсорбции пациента
более чем на 10 % ниже CO
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

7.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

$$\frac{\text{среднее значение абсорбции пациента} \times 10}{\text{CO}} = \text{[DRG UNITS = DU]}$$

Пример: $\dfrac{1.580 \times 10}{0.45} = 35$ **DU**

Интерпретация результатов

Значение Cut-off:	10	DU
Серая зона:	9 - 11	DU
Отрицательный:	< 9	DU
Положительный:	> 11	DU

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com