



Набор ИФА для определения антител класса IgG к ХЛАМИДИИ ПНЕВМОНИЕ

Кат. номер : K14CLG
Количество : 96
Производитель: Radim (Италия)

Методика от 07-2009
Версия 3

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

1. ВВЕДЕНИЕ

Хламидии – это неподвижные, грамотрицательные и обязательно внутриклеточные растущие бактерии, формирующие характерные включения в цитоплазме зараженных паразитами клеток. Они легко различимы в оптическом микроскопе. Известны разные виды хламидий, патогенных для человека: *Chlamydia pneumoniae* и *Chlamydia psittaci*, а также один вид, патогенный только для животных (*C. pecorum*). *Chlamydia trachomatis* является наиболее распространенным в мире возбудителем заболеваний, передающихся половым путем (в 400-500 мил. случаев), и количество инфекций постоянно растет. Беременные женщины, инфицированные *Chlamydia trachomatis*, могут передать эти бактерии ребенку во время родов, вызывая пневмонию или конъюнктивит у новорожденных. Запущенная хламидийная инфекция может привести к хроническому сальпингиту и внематочную беременность или бесплодие. У мужчин *Chlamydia trachomatis* является основной причиной негонекококковых уретритов. Острая хламидийная инфекция часто развивается постепенно, не обнаруживая явных симптомов, но помет привести к хроническим заболеваниям. Во многих случаях первичная инфекция не обнаруживается, и диагностируются только осложнения, причиненные сохранившимися действующими возбудителями.

Вид	Механизмы инфицирования	Болезнь	Диагностика
<i>C. trachomatis</i>	Прямая передача или половым путем: первичной локализацией инфекции в основном является слизистая оболочка глаза или мочеполовой тракт	Венерическая лимфогранулема, Трахома, Конъюнктивит с включениями у новорожденных и взрослых, цервицит, сальпингит, уретрит, эпидидимит, проктит и пневмония у новорожденных.	Серология ПЦР
<i>C. pneumoniae</i>	Инfiltrация слизистой оболочки дыхательных путей	Заболевания дыхательных путей: эндокардит, коронарная болезнь сердца	Микроскопия
<i>C. psittaci</i>	Вдыхание экскрементов зараженных птиц, контакт с инфицированными внутренностями птиц	Орнитоз (пситтакоз)	

2. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор ИФА предназначен для качественного определения антител класса IgG к вирусу *Chlamydia pneumoniae* в человеческой сыворотке или плазме.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Качественное иммуноферментное определение антител IgG-класса к хламидии пневмонии основано на технике иммуноферментного анализа. Микротитровальные лунки стрипов предварительно покрыты антигеном *Chlamydia pneumoniae*, чтобы связать соответствующие антитела образцов. После промывки с целью удаления несвязанного материала добавляется анти-человеческий IgG, конъюгированный пероксидазой хрена. Этот конъюгат связывается со специфическими антителами *Chlamydia pneumoniae*. Иммуный комплекс, сформированный связанным конъюгатом визуализируется добавлением субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), который образует продукт реакции голубого цвета. Интенсивность данного продукта пропорциональна количеству специфических антител IgG к *Chlamydia pneumoniae* в образцах. Для остановки реакции добавляется серная кислота. В конечном результате развивается желтый цвет. С помощью микропланшетного ИФА считывателя считывается абсорбция при 450 нм.

4. МАТЕРИАЛЫ

4.1. Поставляемые реагенты

- MTP** **Покрытый микропланшет:** 1 микропланшет на 96 делимых лунок (12x8), покрытых антигеном хламидии пневмонии; герметично закрыты, в закрывающейся алюминиевой фольге.
- DIL** **Разбавитель образца IgG***:** 1 бутылка содержит 105 мл готового к использованию буфера для разбавления образцов; pH 7,2±0,2; желтого цвета.
- STOP** **Стоп раствор:** 1 флакон содержит 15 мл серной кислоты; 0,2 моль/л. Готовый к использованию.
- WASH** **Промывочный раствор (20x)*:** 1 флакон содержит 50 мл 20-кратного концентрата буфера (pH 7,2±0,2) для промывания лунок.
- CONJ** **Ферментный конъюгат**:** 1 флакон содержит 20 мл кроличьего анти-человеческого IgG, конъюгированного с пероксидазой; голубого цвета, готовый к использ.
- TMB | SUBS** **Раствор субстрата ТМБ:** 1 бутылка содержит 15 мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), готовый к использованию.
- CONTROL +** **Положительный контроль***:** 1 флакон (2 мл) готового к использованию контрольного раствора; желтого цвета.
- C/O** **Пороговый контроль***:** 1 флакон (2 мл) готового к использованию контрольного раствора; желтого цвета.
- CONTROL -** **Отрицательный контроль***:** 1 флакон (2 мл) готового к использованию контрольного раствора; желтого цвета.

* содержит 2% Bronidox L

** содержит 0.2% Bronidox L

*** содержит 0.1% катона и 0.09% азида натрия

4.2. Поставляемые материалы

- 1 держатель для стрипов
- 1 фольга для накрывания
- 1 инструкция по использованию
- 1 план распределения и обозначения для образцов и контролей.

4.3. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.3.1 Ручной анализ

- Микролуночный планшетный считыватель ИФА, настроенный на измерение абсорбции при 450/620 нм.
- Инкубатор, настроенный на 37°C.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропипетки и сменные пластиковые насадки (10,100, 200 и 1000 мкл).
- Вихревой смеситель
- Одноразовые пробирки
- Штатив для пробирок
- Деионизированная или (свежая) дистиллированная вода.
- Таймер

4.3.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

5. СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ

Реагенты остаются стабильными до истечения срока годности, указанной на этикетке, в условиях хранения при температуре 2-8°C

6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Очень важно привести все реагенты к комнатной температуре (20-25°C) перед проведением анализа!

6.1. Покрытый микропланшет

Готовые к использованию делимые лунки покрыты антигеном хламидии пневмонии. Хранить при 2-8°C. Стрипы герметично запакованы. После отделения необходимого количества стрипов, оставшиеся стрипы следует немедленно вернуть в алюминиевую фольгу с поглотителем влаги, которая имеется в наборе. После вскрытия стрипы стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке, при условии хранения при температуре 2-8°C.

6.2. Ферментный конъюгат.

1 флакон содержит 20 мл раствора анти-человеческого IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена, буфером, стабилизаторами, консервантами и неактивным голубым окрасом. Раствор готов к

использованию. Хранить при 2-8°C. После вскрытия раствор стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке, при условии хранения при температуре 2-8°C.

6.3. Контроли.

Положительный, отрицательный и пороговый контроли содержат по 2 мл готового к использованию раствора. Хранить при 2-8°C. После вскрытия контроли стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетках, при условии хранения при температуре 2-8°C.

6.4. Разбавитель образца

1 бутылка содержит 105 мл фосфорнокислого буфера, стабилизаторы, консерванты и неактивный желтый окрас. Используется для разбавления образцов пациента. Готовый к использованию раствор следует хранить при 2-8°C. После вскрытия раствор стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке, при условии хранения при температуре 2-8°C.

6.5. Промывочный раствор (20x)

1 флакон содержит 50 мл концентрата буфера, детергенты и консерванты. После вскрытия промывочный раствор стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке, при условии хранения при температуре 2-8°C.

Разведите промывочный раствор деионизированной или дистиллированной водой 1+19 (напр., 10 мл промывочного раствора + 190 мл деионизированной или дистиллированной воды). После разведения буфер можно хранить в течение 5 дней при комнатной температуре. *Кристаллы, образовавшиеся в растворе, исчезают после подогревания до 37°C на водяной бане. Внимание: подогревайте только количество промывочного раствора, необходимое для проведения анализа.*

6.6. Раствор субстрата ТМБ

Флакон содержит 15 мл системы тетраметилбензидин/перекись водорода. Реагент готов к использованию и должен храниться при 2-8°C в темном месте. Раствор должен быть бесцветным или с легким голубоватым оттенком. Если он становится насыщенно голубым, значит, он может быть зараженным и его следует выбросить. *После вскрытия раствор стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке, при условии хранения при температуре 2-8°C.*

6.7. Стоп-раствор

Флакон содержит 15 мл раствора 0,2 моль/л серной кислоты. Готовый к использованию раствор следует хранить при температуре 2-8°C.

7. СБОР И ПОДГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы (цитрата). Если анализ проводится в течение 5 дней после сбора образцов, образцы следует хранить 2-8°C. В ином случае их следует распределить и хранить замороженными (-70...-20°C). Если образцы хранятся замороженными, смешайте их тщательно после размораживания, перед проведением анализа. *Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов.*

Инактивация образцов нагреванием не рекомендуется.

7.1. Разбавление образцов.

Перед использованием разбавьте все образцы 1:100 разбавителем образца IgG. Пример: накапайте 10 мкл образца + 1 мл разбавителя образца в пробирку для получения раствора 1:100 и тщательно перемешайте его вортексом. *Контроли готовы к использованию, их не нужно разводить.*

8. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

8.1. Подготовка анализа

Внимательно прочтите протокол анализа перед проведением. Надежность результата зависит от строгости соблюдения описанного протокола анализа. Следует придерживаться следующей процедуры при ручном анализе. Перед началом анализа необходимо четко установить на листе результата, поставляемом в наборе, план распределения и обозначения для всех образцов и контролей. Возьмите необходимое количество микротитровочных стрипов или лунок и вставьте их в держатель.

Отведите, по крайней мере:

1 лунку (напр. А1)	Для бланка
1 лунку (напр. В1)	Для отрицательного контроля
2 лунки (напр. С1+D1)	Для порогового контроля
1 лунку (напр. Е1)	Для положительного контроля

Рекомендуется проводить анализ в двух повторностях.

Выполняйте все этапы анализа в заданном порядке и без основательных пауз между этапами. Для каждого контроля или образца используйте новый, чистый одноразовый наконечник для пипетки.

Настройте инкубатор на температуру 37°C.

1. Пипетируйте в соответствующие лунки по **100 мкл** контролей и разбавленных образцов. Оставьте лунку А1 для бланка.
2. Накройте лунки фольгой, поставляемой в наборе.
3. Инкубируйте лунки в течение **60±5 минут при 37±1°C**.
4. По завершению инкубации удалите фольгу, проведите аспирацию содержимого из лунок. и промойте каждую лунку **3 раза 350 мкл** промывочного раствора. Избегайте переливания через край реакционных лунок. Время выдержки между промываниями должно составлять >5сек. Потом осторожно удалите остатки жидкости, постукивая стрипами о промокательную бумагу, прежде чем приступить к следующему шагу!

Промывание критически важно! Недостаточное промывание может привести к неточным результатам и ложно высоким значениям абсорбции.

5. Добавьте **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки, кроме лунки бланка (напр. А1). Накройте фольгой.

6. Инкубируйте в течении **30 минут при комнатной температуре (20-25°C)**. *Не подвергайте воздействию прямых солнечных лучей!*
 7. Промойте лунки как описано в п.4.
 8. Пипетируйте **100 мкл** раствора ТМБ-субстрата во все лунки.
 9. Инкубируйте в течении **15 минут при комнатной температуре (20-25°C)** в темноте.
 10. Пипетируйте **100 мкл** стоп-раствора во все лунки в той же последовательности и количестве, что и раствор субстрата ТМБ. Голубой цвет, появившийся во время инкубации, превращается в желтый.
- Внимание: Высоко-положительные образцы пациентов могут спровоцировать темный осадок хромогена. Этот осадок влияет на считывание оптической плотности. Рекомендуется развести такой образец физраствором поваренной соли в пропорции, например, 1:1. Потом разбавьте образец разбавителем образца IgG 1+100 и умножьте результаты в единицах РАДИМ (РЕ) на 2.
11. Измерьте абсорбцию образцов при 450/620 нм на протяжении 30 минут после добавления стоп-раствора.

* **Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.**

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ОП каждого отрицательного, положительного и порогового контроля должна приниматься во внимание. Наличие или отсутствие антител IgG к хламидии определяется сравнением абсорбции образцов с абсорбцией порогового контроля. Образцы с оптической плотностью более низкой чем порогового контроля считаются нереактивными к анти-хламидийным антителам IgG. Образцы с ОП выше чем пороговый контроль считаются реактивными к анти-хламидийным антителам IgG.

Образцы со значениями абсорбции в пределах +/- 10% порогового контроля считаются сомнительными и должны для подтверждения быть проанализированы повторно.

- Используя автоматический аппарат для микропланшетов RADIM и/или SEAC, спектрофотометрическое считывание будет выполняться автоматически при 3 различных волнах длиной: 450, 405 и 620 нм, таким образом, позволяя расширить диапазон кривой.

8.2. Измерение

Установите микропланшетный считыватель ИФА на ноль, используя бланк в лунке А1. Если по техническим причинам установить его на ноль, используя бланк в лунке А1, невозможно, вычитайте значение абсорбции лунки А1 из всех других измеренных значений абсорбции с целью получения адекватных результатов!

Измерьте абсорбцию всех лунок при 450 нм и запишите все измеренные значения абсорбции в план распределения и обозначения.

Рекомендуется считывание с двойной длиной волны с использованием опорной длины 620 нм.

Где применимов, рассчитайте средние значения абсорбции для всех дубликатов.

При использовании автоматического микропланшетного аппарата производства Radim и/или SEAC, спектрофотометрическое считывание будет автоматически осуществляться при 3х разных длинах волны: 450, 405 и 620 нм, позволяя таким способом расширить область кривой.

9. РЕЗУЛЬТАТЫ

9.1. Критерии объективности анализа

Анализ считается действительным при условии соблюдения следующих критериев:

Бланк	в лунке А1	Значение абсорбции < 0,100
Отрицательный контроль	в лунке В1	Значение абсорбции < 0,200 и < Порогового значения
Пороговый контроль	в С1 и D1	Значение абсорбции 0,150-1,300
Положительный контроль	в лунке Е1	Значение абсорбции > порогового значения

Если данные критерии не соблюдаются, анализ является недействительным, его необходимо повторить.

9.2. Расчет результатов

Пороговое значение является средним значением абсорбции определений пороговых контролей.

Например: *значение абсорбции порогового контроля 0,45 + значение абсорбции порогового контроля 0,41 = 0,86/2 = 0,43*

Пороговое значение = 0,43

9.3 Интерпретация результатов

- Образцы со значением абсорбции выше порогового значения +10%, считаются **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ**.
- Образцы со значением абсорбции в диапазоне порогового значения +10% не являются на положительными, ни отрицательными. Результат считается в СЕРОЙ ЗОНЕ.

Рекомендуется повторить анализ через 2-4 недели с новыми образцами. Если результат оказывается повторно в серой зоне, образец следует считать ОТРИЦАТЕЛЬНЫМ.

- Образцы со значением абсорбции ниже порогового значения - 10%, считаются ОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ.

9.3.1. Результаты в единицах РАДИМ (РЕ)

(Среднее) значение абсорбции пациента $\times 10$ / Пороговое значение = [Единицы РАДИМ] (РЕ)

Например: $\frac{1,204 \times 10}{0,43} = 28$ РЕ

Пороговое значение:	10	РЕ
Серая зона:	9-11	РЕ
Отрицательный:	<9	РЕ
Положительный:	>11	РЕ

10. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1. Точность

Воспроизводимость:

Между анализами	n	Среднее (РЕ)	CV(%)
Позитивная сыворотка	12	9	10,6
	12	32	5,2

Повторяемость:

В пределах анализа	n	Среднее (ОП)	CV(%)
Позитивная сыворотка	20	0,41	7,2
	24	1,37	4,3

10.2. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность может быть определена как возможность отрицательного результата анализа при отсутствии специфического анализата. Составляет 91,7%.

10.3. Диагностическая чувствительность

Диагностическая специфичность может быть определена как возможность положительного результата анализа при наличии специфического анализата. Составляет 90,2%.

10.4. Аналитическая специфичность

Интерференции с гемолитическими, липемическими или иктерическими сыворотками не наблюдаются до момента концентрации 10мг/мл гемоглобина, 5 мг/мл триглицеридов и 0,2 мг/мл билирубина.

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Бактериологическое заражение или множественные циклы замораживания-размораживания образцов могут повлиять на значения абсорбции. Диагноз инфекционного заболевания не должен основываться на результате одного анализа. Точный диагноз должен учитывать историю болезни, симптоматику, а также серологические данные.

У иммуносупрессированных пациентов и новорожденных эффективность серологических данных ограничена.

Антиген Хламидии пневмонии, которым покрыт планшет, состоит из элементарных телец. Перекрестная реакция с Chlamydia trachomatis не исключена с сывороткой, содержащей антигены к LPS и MOMP.

12. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ЗАМЕЧАНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- В соответствии с Европейской директивой 98/79/ЕС, использование производителями диагностического медицинского оборудования ин-витро направлено на обеспечение повторяемости, надежности и эффективности продукта. Таким образом, следует четко придерживаться процедуры анализа, информации и предостережений и замечаний, указанных в инструкции к использованию. Использование аналитических наборов с помощью анализаторов и подобного оборудования должно проверяться. Какие-либо изменения дизайна, состава и процедуры, а также использование в сочетании с иными продуктами, не подтвержденными производителем, не разрешается; ответственность за данные изменения несет пользователь. Производитель не несет ответственности за ложные результаты или инциденты, произошедшие по этим причинам. Производитель не несет ответственности за результаты, полученные в результате визуального анализа образцов пациента.
- Предназначен исключительно для диагностики ин-витро.
- Все материалы человеческого происхождения, использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-НСV. Тем не менее, все образцы и реагенты должны считаться потенциально инфекционными.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия в качестве консерванта; для предотвращения накопления взрывчатых азидов металлов в свинцовых и медных трубопроводах, при смывании реагентов в водосток используйте большое количество воды.
- Не смешивайте реагенты и стрипы из различных партий.

- Не используйте реагенты других производителей вместе с реагентами данного набора.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Используйте только чистую лабораторную посуду, наконечники и дозаторы.
- Не меняйте колпачки от флаконов реагентов во избежание перекрестной контаминации.
- Плотно закрывайте флаконы с реагентами сразу после использования, чтобы избежать испарений и микробной контаминации.
- После первого вскрытия и последующего хранения проверяйте флаконы с конъюгатом и контролями на предмет микробной контаминации, прежде чем приступить к дальнейшему их использованию.
- Во избежание перекрестной контаминации и ложно завышенных результатов, пипетируйте образцы пациентов и реагенты на самое дно лунок, не разбрызгивая их.
- Данный набор предназначен для использования квалифицированным персоналом, осведомленным с правилами лабораторной практики.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: В данной концентрации Bronidox L не несет токсикологической угрозы при контакте с кожей или слизистой оболочкой.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Серная кислота раздражает кожу и глаза! В случае контакта промыть большим количеством воды и обратиться к врачу. Не давать детям!

12.1. Рекомендации по утилизации

Остатки химических препаратов и растворов считаются опасными отходами. Ликвидация такого рода отходов регулируется государственными и местными законами и нормативными документами. По вопросам ликвидации опасных отходов обращайтесь в местные компании ликвидации отходов.

СХЕМА АНАЛИЗА

Подготовка анализа

Подготовьте образцы, контроли и реагенты согласно описанию. Установите план распределения и обозначения для всех образцов и контролей на листе результатов, имеющемся в наборе. Возьмите необходимое количество микротитровочных стрипов или лунок и вставьте их в держатель.

	Бланк (напр. A1)	Контроль -	Контроль +	C/O	Образец (разб. 1+100)
Контроль -	-	100 мкл	-	-	-
Контроль +	-	-	100 мкл	-	-
C/O	-	-	-	100 мкл	-
Образец (разб. 1+100)	-	-	-	-	100 мкл
Накройте лунки фольгой, поставляемой в наборе Инкубируйте 1 час \pm 5 мин. При 37 \pm 1°C Промойте каждую лунку три раза 300 мкл промывочного раствора					
CONJ	-	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Накройте лунки фольгой, поставляемой в наборе Инкубируйте 30 мин при комнатной температуре Промойте каждую лунку три раза 300 мкл промывочного раствора					
TMB/SUBS	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте в точности 15 мин при комнатной температуре в темноте					
STOP	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Фотометрическое измерение при 450 нм (опорная длина волны: 620 нм)					

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

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