



Набор ИФА для качественного определения антител класса IgM к *Chlamydia trachomatis* в сыворотке или плазме человека

Каталог. № : EIA-3811
Количество лунок : 96
Производитель : DRG

Методика от 02-2011
Версия 9.0

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

1. ВВЕДЕНИЕ

Хламидия неподвижная, грамтрицательная, внутриклеточная бактерия, которая образует характерные включения внутри цитоплазмы паразитируемой клетки. Их легко можно увидеть в световой микроскоп. Существует три подвидов хламидий: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*.

Chlamydia trachomatis наиболее распространенный паразит среди заболеваний передающихся половым путем во всем мире (400-500 млн. случаев) и их число постоянно растет.

Беременные, заболевшие *Chlamydia trachomatis*, могут передавать инфекцию детям, приводя к желтухе и пневмонии новорожденных. Невылеченная хламидийная инфекция склонна к переходу в хронические сальпингиты, которые опасны возникновением эктопической беременности и бесплодия. У мужчин *Chlamydia trachomatis* – причина большинства негонококковых уретритов.

Большой проблемой при заболевании хламидией остается частое бессимптомное течение, что приводит к хронизации процесса. В большинстве случаев первичное инфицирование не распознается и диагностируются только последующие, персистирующие инфекции.

Подтип	Механизм инфекции	Заболевание	Диагностика
<i>Chl. trachomatis</i>	Непосредственная передача или половым путем. Первично поражаются слизистые глаз или мочеполового тракта	Венерическая лимфогранулома (ВЛГ) Трахома Желтуха новорожденных и взрослых Цервициты, сальпингиты, уретриты, эпидидимиты, проктиты и пневмония новорожденных	Серология ПЦР Микроскопия
<i>Chl. pneumoniae</i>	Инfiltrация слизистой дыхательного тракта	Респираторные заболевания Возможно эндокардиты и коронарная болезнь	
<i>Chl. psittaci</i>	Вдыхание фекалий пораженного птиц; контакт с инфицированными внутренними органами птиц	Орнитозы (пситтакозы)	

2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного определения антител класса IgM к *Chlamydia trachomatis* в человеческой сыворотке или плазме (цитратной).

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор предназначен для качественного иммуноферментного определения антител класса IgM к *Chlamydia trachomatis* проводится на основании методики ИФА.

Микротитрационные лунки предварительно покрыты *Chlamydia trachomatis* антигеном для связывания соответствующих антител образца.

После промывания для удаления несвязанного материала образца, добавляется анти-IgM-конъюгат, меченный

пероксидазой хрена. Этот конъюгат связывается с захваченными хламидия специфическими антителами.

Иммунный комплекс связанного конъюгата визуализируется добавлением ТМБ-раствора, который дает образование продукта реакции голубого цвета, интенсивность которого пропорциональна количеству специфических антител IgM к *Chlamydia trachomatis* в образце пациента. Для остановки реакции добавляется серная кислота. Это дает образование конечного желтого цвета. С помощью фотометра измеряется абсорбция раствора.

4. МАТЕРИАЛЫ

4.1 Поставляемые реагенты

- Лунки, покрытые *C.trachomatis* (IgM):** 12 микрострипов по 8 лунок с привитыми *C.trachomatis* антигенами; вакуумная упаковка, фольговый пакет.
 - IgM-растворитель образцов***:** 1 бутылка содержащая 100 мл готового к использованию буфера для разведения образцов, pH 7,2 ± 0,2. Зеленый, белая крышка.
 - Стоп-раствор:** 1 бутылка с 15 мл серной кислоты, 0,2 моль/л. Готовая к использованию, красная крышка.
 - Промывочный раствор (20x конц.)*:** 1 бутылка 50 мл 20x концентр. буфера (pH 7,2 ± 0,2) для промывания, белая крышка.
 - Конъюгат антител класса IgM к *C.trachomatis***:** 1 бутылка с 20 мл меченного пероксидазой кроличьего антитела против человеческого IgM. Красный, черная крышка. Готовый к использованию.
 - Раствор субстрата ТМБ:** 1 бутылка с 15 мл 3,3, 5,5 – тетраметилбензидин (ТМБ). Готовый к использованию. Желтая крышка.
 - Положительный контроль***:** 1 бутылка с 2 мл. Желтого цвета, красная крышка. Готовый к использованию.
 - Пороговый контроль****:** 1 бутылка с 3 мл. Желтого цвета, зеленая крышка. Готовый к использованию.
 - Отрицательный контроль***:** 1 бутылка с 2 мл. Желтого цвета, синяя крышка. Готовый к использованию.
- * - содержит 0,01% Бронидокс L после разведения
** - содержит 0,2% Бронидокс L
*** - содержит 0,1% Катон

4.2 Поставляемые материалы

- 1 держатель для стрипов
- 1 фольга для накрывания
- 1 протокол исследования
- 1 схема внесения и идентификации

4.3 Необходимые материалы и оборудование

- Микропланшетный ИФА-ридер предназначенный для измерения абсорбции при 450/620 нм
- Инкубатор 37°C
- Ручное или автоматическое устройство для промывания лунок
- Пипетки для внесения объемов между 10 и 1000 мкл
- Трубчатый миксер типа вортекс
- Деионизированная или (свежая) дистиллированная вода
- Одноразовые пробирки
- Таймер

5. СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ

Реагенты стабильны до истечения срока годности указанного на этикетке при температуре 2-8 °C.

6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Очень важно перед началом исследования привести все реагенты, образцы и контроли к комнатной температуре (20-25°C)!

6.1 Привитые делимые стрипы

Готовые к использованию стрипы покрыты антигеном *Chlamydia trachomatis*. Хранить при температуре 2-8°C.

Стрипы запечатаны в вакууме. Сразу же после взятия необходимого количества, оставшиеся должны быть запечатаны в вместе с десикантом в тот же пакетик и храниться при 2-8°C до истечения срока годности.

6.2 Конъюгат антител класса IgM к *Chlamydia trachomatis*

Бутылка, содержит 20 мл раствора пероксидазы хрена с антителами к человеческому IgM, буфером, стабилизатором и инертным красным красителем. Раствор готовый к использованию. Хранить при 2-8°C. После первого вскрытия стабильность сохраняется до окончания срока пригодности при 2-8°C.

6.3 Контроли

Бутылки, меченные как положительный, контроль величины исключения и отрицательный контроль, содержат готовый к использованию контрольный раствор. Он содержит 0,1% катона и должен храниться при 2-8°C. После первого вскрытия стабильность сохраняется при 2-8°C до окончания срока пригодности.

6.4 Разбавитель образца IgM

Бутылка, содержит 100 мл фосфатного буфера, античеловеческий IgG, стабилизаторы, консерванты и инертный зеленый краситель. Он используется для разбавления образцов. Составляющим раствором есть античеловеческие антитела класса IgG, которые используются для устранения конкурентного ингибирования специфических IgG антител для устранения ревматоидного фактора. Готовый к использованию раствор должен храниться при 2-8°C. После первого вскрытия стабильным остается при 2-8°C до окончания срока пригодности.

6.5 Промывочный раствор (20х конц.)

Бутылка содержит 50 мл концентрированного буфера, детергенты и консерванты. Разбавить промывочный раствор 1+19, напр., 10 мл промывочного раствора + 190мл свежей и не содержащей микробов редистиллированной воды. Разбавленный буфер стабилен при 2-8°C четыре недели. Кристаллы в растворе в растворе исчезают при нагревании до 37°C в водяной бане.

После первого открытия раствор стабильный до окончания срока годности.

6.6 Раствор субстрата ТМБ

Бутылка, содержащая 15 мл системы ТМБ/перекиси водорода. Реагент готовый к использованию и должен храниться при 2-8°C, избегая света. Раствор должен быть бесцветным или иметь слегка голубой оттенок. Если субстрат приобретет голубой окрас, значит, он загрязнен и должен быть уничтожен. После первого вскрытия сохраняет стабильность до окончания срока годности при 2-8°C.

6.7 Стоп-раствор

Бутылка, содержит 15 мл 0,2 М раствора серной кислоты. Этот готовый к использованию раствор должен храниться при 2-8°C и стабилен до окончания срока пригодности.

7. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Используйте в этом исследовании образцы сыворотки или плазмы (цитратной). Если анализ проводится в течении 5 дней после сбора образцов, их следует содержать при 2-8°C; иначе следует приготовить аликвоты и хранить замороженными (-70 –20°C). Если образцы хранятся замороженными, перед исследованием их следует смешать. Избегайте повторных циклов замораживания / размораживания.

7.1 Разбавление образцов

Перед анализом образцы должны быть разбавлены **1+100** IgM разбавителем образцов.

Внесите 10 мкл образца и 1 мл IgM разбавителя образца в пробирку для получения 1+100 разбавления и тщательно перемешайте вортексом.

8. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

8.1 Приготовление к исследованию

Внимательно **перед** исследованием прочитайте протокол. От этого зависят результаты исследования.

Следующая процедура предназначена только для ручной методики. При проведении исследования на автоматических ИФА-системах, рекомендуется увеличить количество промываний с 3 до 5, как и объем промывочного раствора с 300 мкл до 350 мкл, во избежание недостаточности промывки.

Перед началом исследования нужно установить план последовательности и количества добавления для всех реагентов исследования.

Отделите необходимое количество лунок и поместите их в держатель стрипов.

Пожалуйста, поместите как минимум:

1 лунка (напр. А1) – для бланка субстрата

1 лунка (напр., В1) – для отрицательного контроля

2 лунок (напр. С1+D1) – для порогового контроля

1 лунка (напр., Е1) – для положительного контроля

Рекомендуется определять контроли и образцы сыворотки в дубле.

Проводите все шаги анализа в предложенном порядке и избегайте задержек между этапами.

Для внесения контролей и образцов следует использовать чистые

и сменные наконечники.

Настройте инкубатор на 37°C±1°C

1. Внесите 100 мкл контролей и разбавленных образцов в соответствующие лунки. Оставьте лунку А1 для бланка субстрата.
2. Накройте лунки поставляемой фольгой.
3. **Инкубируйте 1 час ± 5 минут при 37°C±1°C.**
4. После завершения инкубации удалите фольгу, аспирируйте содержимое лунок и промойте лунку **три раза 300 мкл промывочного раствора**. Избегайте переливания через край лунок для реакции. Время замачивания между каждым циклом промывания должен быть больше 5 сек. После окончания промывания удалите остатки жидкости постукиванием стрипами на бумажное полотенце перед началом следующего шага.
Примечание: Промывание – очень важный шаг! Неточное промывание приведет к неточным результатам.
5. Внесите 100 мкл конъюгата антител класса IgM к *Chlamydia trachomatis* в каждую лунку, кроме лунки бланка (напр. А1). Накройте фольгой.
6. **Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре. Избегайте прямого солнечного света.**
7. Повторите шаг 4.
8. Внесите 100 мкл раствора ТМБ субстрата в каждую лунку.
9. **Инкубируйте точно 15 минут при комнатной температуре в темноте.**
10. Внесите 100 мкл стоп раствора во все лунки в том самом порядке и том самом степени, что и раствор ТМБ субстрата.
Голубой цвет измениться на желтый во время инкубации.
Примечание: Высоко положительные образцы пациентов могут приводить к темному осадку хромогена, что влияет на считанную ОП. Рекомендуется предварительное разбавление физиологическим раствором хлорида натрия, например 1+1. Потом разбавьте образец 1+100 буфером для разбавления и умножьте результаты в единицах ДРГ (ДЕ) на 2.
11. Измерьте абсорбцию образцов при 450-620 нм в течении 30 минут после добавления стоп раствора.

8.2 ИЗМЕРЕНИЕ

Приведите фотометр к нулю, используя **бланк в лунке А1**.

Если, в связи с техническими причинами, фотометр не может быть приведен к нулю, вычитайте для получения надежных результатов абсорбцию лунки А1 с других значений абсорбции.

Измерьте абсорбцию всех лунок **при 450 нм** и запишите значения для каждого контроля и образцов пациента в идентификационный план.

Для сравнения рекомендуется измерение при 620 нм.

После определите значение **средней абсорбции** всех дубликатов.

9. РЕЗУЛЬТАТЫ

9.1 Критерии достоверности

Исследование считается достоверным при соблюдении мледующих критериев:

- Бланк субстрата (А1) – абсорбция **ниже 0,100**
- Отрицательный контроль (В1) - абсорбция **ниже 0,200 и ниже порогового значения**
- Пороговый контроль (С1 и D1) – абсорбция в границах между **0,150 и 1,30**
- Положительный контроль в Е1 - абсорбция **выше значения абсорбции порогового значения.**

Если вышеуказанные критерии не соблюдаются, исследование считается неверным и его необходимо повторить.

9.2 Вычисление результатов

Пороговое значение равна средней абсорбции пороговых контролей.

*Пример: величина абсорбции порогового контроля 0,44 + значение абсорбции порогового контроля 0,42 = 0,86/2 = 0,43
Пороговое значение = 0,43.*

9.3 Интерпретация результатов

Образцы считаются **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ**, если значение их абсорбции выше на 10% от порогового значения

Образцы со значением абсорбции больше или меньше на 10% от порогового значения не должны считаться чисто положительными или отрицательными и относиться к **серой зоне**.

Рекомендуется повторить исследование через 2-4 недели со свежей сывороткой. Если и после этого результаты попадут в серую зону, то их считают **ОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ**.

Образцы считаются **ОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ**, если значение абсорбции ниже порогового значения более чем на 10%.

9.3.1 Результаты в единицах ДРГ

Значение абсорбции (среднее) пациента $\times 10 / ПЗ = [Единицы ДРГ = ДЕ]$

Пример: $1,204 \times 10 / 0,43 = 28 ДЕ$

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

10. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Точность

В исследовании	n	Среднее	КВ (%)
Положительная сыворотка	12	78,5	12,1
Между исследованиями	n	Среднее	КВ (%)
Положительная сыворотка	24	1,29	3,1

10.2 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяется как возможность анализа определять отрицательный результат при отсутствии специфических аналитов. Составляет >95%.

10.3 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется как возможность анализа определять положительный результат в присутствии специфического аналита. Составляет 83,3%.

10.4 Влияние

Влияние гемолитических, липемических или иктерических сывороток не наблюдается до концентрации 10 мг/мл гемоглобина, 5 мг/мл триглицеридов и 0,2 мг/мл билирубина.

ПРИМЕЧАНИЕ: Результаты относятся к группам изучаемых образцов; не существует гарантированных спецификаций.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Бактериальное загрязнение или повторные циклы замораживания – размораживания могут влиять на величину абсорбции. Диагноз инфекционных заболеваний не должен базироваться на результатах одного исследования. Для точного диагноза необходимо исходить из клинической истории, симптомов и серологического исследования. Только серологические данные иммунокомпромиссных пациентов и новорожденных имеют ограниченные результаты.

Антиген хламидии трахоматис, который привит к планшету, включает элементарные тела. Перекрестная реактивность хламидий пневмонии не может быть выключена для сыворотки, содержащей антитела к LPS и MOMP.

12. ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- В соответствии с параграфом 2б пункта 1 европейского директива 98/79 ЕС использование «in vitro» диагностики медицинских аппаратов предусмотрено производителем для достижения точности результатов и безопасности аппарата. В связи с этим нужно четко следовать инструкции и предостережениям в процессе анализа. Использование исследованиевых образцов с анализаторами и подобным оборудованием нужно утверждать. Любые изменения в дизайне, составляющих и процедуре проведения анализа как и использование с другими продуктами, не указанными в инструкции, не позволены. Пользователь сам несет ответственность за такие изменения. Производитель не несет ответственность за неправильные результаты или несчастные случаи из-за выше перечисленных причин. Производитель не несет ответственность за визуальный анализ образцов пациента.
- Только для диагностики in vitro.
- Все компоненты человеческого происхождения, которые использованы в изготовлении этих реагентов были протестированы методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.
- Не используйте компоненты разных наборов.
- Не используйте никакие компоненты наборов других производителей.
- Не используйте наборы после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Используйте только чистые пипетки, насадки к ним и другие лабораторные приспособления.
- Не путайте крышки разных растворов.
- После забора реагента закрывайте немедленно флаконы.
- После первого использования и последующего хранения проверьте реагенты для исключения микробной контаминации.
- Во избежания контаминации и ложно высоких результатов пипетируйте аккуратно, без проливания.

Осторожно: При используемой концентрации Бронидокс L токсичен! Не глотать. Избегайте контакта с кожей и слизистыми.

Осторожно: Серная кислота раздражает кожу и глаза. Держите подальше от детей. При попадании в глаза обильно промойте водой и обратитесь к врачу.

12.1 РУКОВОДСТВО ПО УТИЛИЗАЦИИ

Остатки химических реактивов и препаратов всегда опасны. Их утилизация регулируется национальным и местным законодательством и законами. Советы по уничтожению остатков могут быть предоставлены Вашими местными компаниями, которые занимаются утилизацией.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

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