



Набор ИФА для определения антител класса IgG к Chlamydia pneumoniae

Каталог. № : EIA-3912
Количество : 96
Производитель: DRG (США)

Методика от 28-07-2008

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

1 ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

ИФА-набор производства фирмы DRG® Chlamydia pneumoniae IgG предназначен для качественного определения антител класса G к Chlamydia pneumoniae в сыворотке или плазме(цитратной) человека.

2 ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Качественный иммуноферментное определение антител класса IgG к Chlamydia pneumoniae основывается на методике ИФА.

Микротитровальные стрипы покрыты антигенами Chlamydia pneumoniae, которые связывается с соответствующими антителами образца. После промывки лунок для удаления всего несвязанного материала добавляется конъюгат иммуноглобулинов, иммунизированных IgG человека, меченных ПХ (пероксидаза хрена). Конъюгат связывается с иммобилизованными специфичными к Chlamydia pneumoniae антителами. Сформированные с участием конъюгата иммунные комплексы визуализируются добавлением ТМБ-субстрата – появляется голубое окрашивание продуктов реакции. Интенсивность окрашивание пропорциональна количеству IgG антител образца, специфичных к Chlamydia pneumoniae. Для остановки реакции добавляется серная кислота. Окрашивание меняется на желтое. Затем считывается абсорбция при 450 нм на считывателе для микротитровальных планшетов.

3 Материалы

3.1 Поставляемые реагенты

- **Лунки, покрытые Chlamydia pneumoniae IgG:** 12 делимых 8 луночных стрипов, лунки покрыты антигенами Chlamydia pneumoniae; в фольгированной вакуумной упаковке с замком.
- **Разбавитель для IgG образцов** ***: 1 флакон со 100 мл буферного раствора для разбавления образцов; pH 7.2 ± 0.2; желтого цвета; готов к использованию; белый колпачок.
- **Стоп-раствор:** 1 флакон с 15 мл серной кислоты, 0.2 моль/л; готов к использованию; красный колпачок.
- **Промывочный раствор (конц. 20x)** *: 1 флакон с 50 мл 20-кратно концентрированного буфера (pH 7.2 ± 0.2) для промывки лунок; белый колпачок.
- **Конъюгат Chlamydia pneumoniae анти-IgG** **: 1 флакон с 20 мл меченных ПХ кроличьих антител иммунизированных человеческим IgG.; красного цвета, готов к использованию; черный колпачок.
- **Раствор ТМБ субстрата:** 1 флакон с 15 мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию; желтый колпачок.
- **Chlamydia pneumoniae IgG положительный контроль** ***: 1 флакон с 2 мл; желтого цвета; готов к использованию; красный колпачок.

- **Chlamydia pneumoniae IgG контроль Cut-off** ***: 1 флакон с 3 мл; желтого цвета; готов к использованию; зеленый колпачок.

Chlamydia pneumoniae IgG отрицательный контроль ***: 1 флакон с 2 мкл; желтого цвета; готов к использованию, голубой колпачок.

* содержит 0.01 % катона после разведения

** содержит 0.2 % Bronidox L

*** содержит 0.1 % Катон

3.2 Дополнительные компоненты набора

- 1 Держатель для стрипов
- 2 Пленки для накрывания
- 1 Инструкция по применению

3.3 Необходимые материалы и оборудование

- ИФА – считыватель с возможностью измерения абсорбции на 450/620 нм.
- Инкубатор на 37°C
- Ручное или автоматизированное оборудование для промывки лунок
- Пипетки на 10 и 1000 мкл
- Воротковый трубчатый миксер
- Деионизированная или (свеже)дистиллированная вода
- Одноразовые пробирки
- Таймер

4 СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ

Реагенты стабильны до даты срока годности, указанной на флаконе при условии хранения при 2-8°C.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Очень важно довести все реагенты до комнатной температуры перед постановкой анализа (20-25)°C!

5.1 Стрипы луночные с покрытием

Готовые к использованию делимые до 1 лунки стрипы покрыты антигенами Chlamydia pneumoniae. Хранить при 2-8°C. Стрипы имеют вакуумную упаковку.

Сразу после отделения необходимого для 1 постановки количества лунок, оставшиеся стрипы упаковать в фольгированный пакет с влагопоглотителем. Хранить при 2-8°C; стабильны до даты срока годности.

5.2 Конъюгат анти-IgG Chlamydia pneumoniae

Флакон содержит 20 мл антител с пероксидазной меткой иммунизированных человеческим IgG, в буфере со стабилизаторами, консервантами и инертным красным красителем. Раствор готов к использованию. Хранить при 2-8°C. *После первого открывания стабильны до даты срока годности при 2-8°C.*

5.3 Контроли

Флаконы с положительным, отрицательным и контролем Cut-off содержат готовые к использованию растворы контрольных сывороток. Содержат 0.1% Kathon и требуют хранения при 2-8°C.

После первого открывания стабильны до даты срока годности при 2-8°C.

5.4 Разбавитель для IgG образцов

Флакон содержит 100 мл фосфатного буфера со стабилизаторами, консервантами, и инертным желтым красителем. Используется для разведения образцов пациентов. Готов к использованию. Хранить при 2-8°C.

После первого открывания стабильны до даты срока годности при 2-8°C.

5.5 Промывочный раствор (20х конц.)

Флакон содержит 50 мл концентрированного буфера, детергенты, консерванты.

Развести промывочный раствор **1+19**; e.g. 10 мл промывочного раствора +190 мл свежей дистиллированной воды. Разведенный буфер стабилен 5 дней при комнатной температуре. Кристаллы в растворе исчезают при нагреве до 37°C на водяной бане.

После первого открывания концентрат стабилен до даты срока годности.

5.6 ТМБ–субстрат

Флакон содержит 15мл смеси ТМБ/Н₂О₂.

Реагент готов к использованию и должен храниться при 2-8°C в темном месте. Раствор должен быть бесцветным или со слабым голубоватым оттенком. Если субстрат приобрел голубую окраску, это означает, что он мог быть инфицирован. В таком случае его необходимо выбросить.

После первого открывания стабилен до даты срока годности при 2-8°C.

5.7 Стоп-раствор

Флакон содержит 15 мл 0.2 М раствора серной кислоты (R 36/38, S 26). Этот готовый к использованию раствор необходимо хранить при 2-8°C. *После первого открывания стабилен до даты срока годности.*

6 ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для данного метода анализа необходимо использовать сыворотку крови. Если анализ выполняется в не позднее чем через 24 часа после забора образцов, образец хранится при 2-8°C; в ином случае необходимо поделить образец на аликвоты и хранить в глубокой заморозке (от -70 до -20°C). Если образцы хранятся замороженными, оттаявшие образцы необходимо хорошо смешать перед тестированием. Избегать повторного замораживания/размораживания.

6.1 Разбавление образцов

Перед постановкой анализа все образцы необходимо разбавить **1+100** разбавителем для IgG образцов. Внести 10мкл образца и 1мл разбавителя в пробирку разведения 1 к 100 и тщательно смешать на вортексном миксере.

Положительные и отрицательные контроли готовы к использованию и не должны разбавляться.

7 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

7.1 Подготовка к постановке анализа

Перед проведением теста внимательно прочитайте инструкцию. Надежность результатов зависит от четкого следования данной инструкции.

Следующее описание действительно только для ручной процедуры. При выполнении анализа на автоматизированной системе мы рекомендуем увеличить число промывок с 3 до 5 и объем промывателя на лунку с 300мкл до 350мкл.

Перед проведением теста необходимо составить план расположения и идентификации для всех образцов и контролей. (Форма плана поставляется с набором).

Отобрать необходимое количество лунок и вставить их в держатель.

Зарезервировать по меньшей мере:

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

Рекомендуется ставить контроли и образцы в дублях.

Все этапы процедуры должны выполняться в ниже приведенном порядке без больших перерывов.

Чистый одноразовый наконечник необходимо использовать для раскапывания каждого контроля и образца.

Инкубатор на строить на 37° ± 1°C.

1. Раскапать по 100мкл контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки. Оставить лунку A1 для бланка субстрата.

2. Накрыть лунки пленкой поставляемой в наборе.

3. Инкубировать 1 час ± 5 минут при 37±1°C.

4. После инкубации удалить содержимое лунок и промыть каждую лунку три раза 300мкл промывочного раствора. *Не допускать переполнения лунок! Время замачивания более 5 сек. В конце осторожно удалить оставшуюся жидкость вытряхнув содержимое стрипов на впитывающую бумагу!*

Примечание: Промывка очень важна! Недостаточная промывка сказывается на точности метода и может привести к ложно завышенным значениям абсорбции.

5. Раскапать по 100 мкл конъюгата во все лунки кроме бланка (e.g. A1). Накрыть пленкой.

6. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре. Не подвергать воздействию прямого солнечного света!

7. Повторить этап 4.

8. Раскапать по 100 мкл ТМБ субстрата во все лунки

9. Инкубировать ровно 15 минут при комнатной температуре в темноте.

10. Раскапать по 100мкл стоп-раствора во все лунки в том же порядке что и ТМБ.

Любое голубое окрашивание должно перейти в желтое.

Примечание: Высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена, что может повлиять на значения оптических плотностей. Рекомендуется предварительное разведение таких образцов солевым физиологическим раствором, например в соотн. 1к1. Затем разведите образец 1+100 разбавителем и умножьте результат в ДЕ на 2.

11. Измерить абсорбцию образца на 450/620нм не позднее чем через 30 минут после добавления стоп-раствора.

7.2 Измерение

Настроить ИФА-считыватель на нуль, для этого используется бланк субстрата в лунке A1.

Если - по техническим причинам - ИФА-считыватель не может быть настроен на нуль, используя бланк субстрата в лунке A1, вычтите значения абсорбции лунки A1 из всех остальных измеренных значений абсорбции!

Измерить абсорбцию всех лунок при 450 нм и записать значения абсорбции на для каждого образца и контроля в план расположения и идентификации.

Рекомендуется считывать результат на двойной длине волны: 450 нм и 620 нм (как сравнительная).

Для измерений в дублях подсчитать средние значения.

8 РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1 Критерии оценки анализа

Анализ считается действительным если одновременно:

- значение абсорбции бланка субстрата в A1: **менее 0.100.**
- значение абсорбции отрицательного контроля в B1: **менее 0.200.**
- значение абсорбции контроля Cut-off в C1 и D1: **между 0.250 и 0.900.**
- значение абсорбции положительного контроля в E1: **равно или более cut-off.**

Если эти критерии не соблюдаются, исследование считается недействительным и должен быть повторен.

8.2 Подсчет результатов

Cut-off = среднее значение определений дублей контроля Cut-off.

Пример:

Значение абсорбции контроля Cut-off 0.45+ значение абсорбции контроля Cut-off 0.41 = 0.86

0.86 / 2 = 0.43

Cut-off = 0.43

8.3 Интерпретация результатов

- образцы считать **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ** если абсорбция более чем на 10% выше cut-off
 - образцы с абсорбцией от 10% выше до до 10% ниже cut-off считать **СОМНИТЕЛЬНЫМИ**.

Рекомендуется при этом повторить тест через 2 - 4 недели на свежих образцах. Если результат опять сомнительный, такие образцы считать **ОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ**.
 - образцы считаются **ОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ** если абсорбция более чем на 10% ниже cut-off.

8.3.1 Результаты в единицах ДРГ (ДЕ)

(Средне значение абсорбции пациента x 10) / Cut-off = [Единицы ДРГ = ДЕ]

Пример: (1.204 x 10) / 0.43= 28 ДЕ

Cut-off: 10 ДЕ

Сомнительный: 9-11 ДЕ

Отрицательный: <9 ДЕ

Положительный: >11 ДЕ

9 Характеристики анализа

9.1 Точность

Между анализами	К-во	Среднее (ДЕ)	КВ (%)
-----------------	------	--------------	--------

Полож. сыворотка	12	32	5.2
------------------	----	----	-----

В анализе	К-во	Среднее (ДЕ)	КВ (%)
-----------	------	--------------	--------

Полож. сыворотка	24	1.37	4.3
------------------	----	------	-----

9.2 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - это способность анализа показать отрицательный результат при отсутствии специфичного анализата. Равна 91.7%.

9.3 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность – это способность анализа показать положительный результат в присутствии специфичного анализата. Равна 90,2%.

9.4 Ограничения анализа:

Влияние гемолизированных, жирных или желтушных образцов не отмечалось при концентрации:

гемоглобина до 10 мг/мл,

триглицеридов до 5 мг/мл

билирубина до 0.2 мг/мл.

Примечание: результаты относятся к группам исследованных образцов, гарантированных спецификаций нет.

10 ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Бактериологическое загрязнение или повторные циклы замораживания- размораживания образцов может повлиять на значения абсорбции. Диагностика инфекционного заболевания не должна основываться на результате единичного исследования. При точном диагнозе принимается во внимание клиническая история, симптоматика, а также серологические данные.

В иммунодепрессивных пациентов и новорожденных серологические данные имеют только ограниченное значение. Антиген Chlamydia pneumoniae, нанесенный на планшеты, состоит из элементарных частиц. Перекрестная реакция Chlamydia pneumoniae с сыворотками, содержащими LPS и МОМР, не должна исключаться.

11. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- не использовать в одной постановке специфические реагенты из разных лотов (см.3.1)

- возможно использовать в одной постановке общие реагенты (см.3.2) из разных лотов

- не использовать реагенты после окончания срока годности

- нельзя хранить или оставлять реагенты или образцы при высоких температурах или в местах возможной контаминации
 - использовать только чистую лабораторную посуду, избегать контакта реагентов с ионами металлов или окислителями

- использовать дистиллированную или деионизированную воду, хранить в абсолютно чистых контейнерах

- для каждого реагента или образца необходимо использовать новый одноразовый наконечник пипетки

- не менять процедуру анализа. Несоблюдение точного времени инкубации и количеств добавляемых реагентов, а так же температуры инкубации может привести к неправильным результатам.

- восстанавливать лиофилизированные реагенты согласно указаниям на этикетках флаконов. Любое отклонение в использовании реагентов или неправильные количества могут повлиять на надежность результата. Если процедура ручная важно использовать калиброванные пипетки и следовать правилам инструкций по эксплуатации.

- при проведении анализа использовать одноразовые перчатки

- не пипетировать реагенты ртом

- не курить, не есть, не пить и не пользоваться косметикой во время проведения анализа

- Хромоген и блокирующий реагент требуют осторожного обращения. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При контакте промыть большим количеством воды.

- Все материалы человеческого происхождения, используемые для приготовления стандартов и контролей, были протестированы и показали отрицательную реакцию на HBsAg, при тестировании на присутствие антител к HCV и HIV также дали отрицательный результат. Однако, не существует метода анализа, который гарантировал бы полное отсутствие вирусов HIV, HCV и Hepatitis B. С реагентами набора следует обращаться как с потенциально биологически опасными.

- избегать проливания и образования аэрозолей; в таких случаях промыть 3% раствором гипохлорита натрия. Любой подобный очиститель считать потенциально инфицированным и соответствующим образом утилизировать.

- некоторые реагенты содержат азид натрия в качестве консерванта. При утилизации смывать большим количеством воды.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»

Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.com

www.diameb.com