



Набор для определения ХЛАМИДИЙ IgG

Кат. номер : K4CG
Количество : 96
Производитель: Radim (Италия)

Методика от 03-2008

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор ИФА предназначен для качественного определения анти-хламидийных антител класса IgG в человеческой сыворотке или плазме.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Это набор основан на методе иммуоферментного анализа (ИФА), где пероксидаза хрена используется как ферментный конъюгат. В течение первой инкубации, антитела к хламидии IgG, при их наличии, связываются с антигеном хламидии (скротип L2), нанесенным на лунки. В цикле промывки удаляется весь свободный материал. В последующей инкубации второе антитело (анти-человеческий IgG, соединенный с пероксидазой хрена) связывается с комплексом хламидия-антиген-антитело. После следующего промывочного цикла в лунки добавляется бесцветный раствор хромогена (ТМВ) в субстратном буфере, где образуется цветное вещество путем реакции с ферментом пероксидазы. Развитие цвета останавливается добавлением H₂SO₄. Интенсивность цвета, измеряемая на спектрофотометре при 450 нм и 405 нм, будет таким образом прямо пропорциональна концентрации антител класса IgG к хламидии в контролях и образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПОДГОТОВКА И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8°C
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 2 месяцев.

3.1 Специфические реагенты

- **Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок с привитым очищенным антигеном хламидии. Хранить неиспользуемые лунки при 2-8°C в соответствующей полиэтиленовой сумке, тщательно закрытым.
- **Положительный контроль:** 1 флакон (2 мл) основы сыворотки, реактивной к анти-хламидии IgG. Консервант: NaN₃. (<0.1%). Готов к использованию.
- **Пороговый контроль:** 1 флакон (2,5 мл) основы сыворотки, реактивной к анти-хламидии IgG. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Готов к использованию, синего цвета.
- **Ферментный конъюгат:** 1 флакон (14 мл) мышиного моноклонального анти-человеческого IgG, конъюгированного с HRPO в основе сыворотки со стабилизаторами. Консервант: неомидин. Готов к использованию, розоватого цвета.

3.2 Общие реагенты для наборов панелей TORCH – STD и детских болезней

- **Промывочный раствор (концентрированный):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween 20. Консервант: тимеросал (<0.05%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 дистиллированной водой. В случае нерастворимых кристаллов рнсуспензировать раствор. Поместив флакон на несколько минут в температуру 37°C. Хранить разбавленный промывочный расвор в течении 30 дней при 2-8°C.
- **Разбавитель образца (концентрированный):** 1 флакон (20 мл) основы сыворотки и стабилизаторов, красного цвета. Консервант: NaN₃. (<0.1%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 с предварительно разбавленным промывочным раствором. Хранить разведенный разбавитель образца в течении 30 дней при 2-8°C.
- **Отрицательный контроль:** 1 флакон (2 мл) основы сыворотки, неактивной к анти-хламидии IgG. Консервант: NaN₃. (<0.1%). Готовый к использованию, красного цвета.
- **Хромоген:** 2 флакона (15 мл) ТМВ с цитрат-фосфатным буфером, DMSO и H₂O₂.
- **Стоп раствор:** 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄. Готовый к использованию.
- **Самоклеющиеся пленки для планшета.**
- **Полиэтиленовый мешочек.**

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными насадками.
- Инкубатор, настроенный на 37+/-2 °C.
- Мерные колбы для разбавления образцов.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр с диапазоном 0-3,0 A, способный измерять абсорбцию при 450 и 405.
- Миллиметровая графическая бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводится 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. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ЗАМЕЧАНИЯ

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

- Не смешивайте специфичные реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
 - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
 - периодам инкубации и температуре,это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелюбопытная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-НСV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.

6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко липематические или гемолизированные образцы могут повлиять на результаты. Образцы плазмы могут содержать волокнистые вещества, которые могут повлиять на анализ; перед анализом убедитесь, что образцы всегда идеально чистые. Храните образцы при 2-8°C в течении 1 недели. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы до -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Перед использованием разбавьте образцы 1:300 разведенным разбавителем образца (см. РЕАГЕНТЫ). Пример: 10 мкл образца + 2990 мкл разбавителя образца.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- приведите все реагенты к комнатной температуре.
 - переворачивая образец, смешайте его перед использованием.
1. Приготовьте лунки в двойном экземпляре для контролей и по одному для бланка и образцов.
 2. Пипетируйте в соответствующие лунки по **100 мкл** контролей и разбавленных образцов.
Примечание: *контроли не должны разбавляться.*
 3. Пипетируйте **100 мкл** разведенного разбавителя образца в лунку бланка.
 4. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **60+/-5 минут при 37+/-2°C**.
 5. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию жидкости из лунок.
 6. Добавьте во все лунки **100 мкл** ферментного конъюгата.
 7. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **30+/-2 минут при 37+/-2°C**.
 8. Промойте лунки как описано в п 5.
 9. Пипетируйте **100 мкл** хромогена во все лунки.
 10. Инкубируйте лунки в течении **10 минут при 37+/-2°C** или **15 минут при комнатной температуре (18-25°C)**. Избегайте попадания прямого солнечного света.
 11. Пипетируйте **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
 12. Считайте ОП желательно бихроматичным спектрофотометром при **450 нм** с референтной длиной волны 620 нм (обнулив аппарат лункой бланка) в течении **15 минут** после завершения анализа.

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

8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 22 в оригинале инструкции).

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 неактивными 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.

9.1 Пример типичных результатов:

Данные значения должны приниматься как пример и не должны использоваться как экспериментальные данные.

Описание	ОП 450 нм
Отрицательный контроль	0,082
Пороговый контроль	0,450
Положительный контроль	2,200
Образец	0,889

Проверенный образец положительный к анти-хламидийным антителам IgG.

9.2 Критерии оценки

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что контрольные абсорбции находятся в следующих пределах:

Описание	Ожидаемые значения
Отрицательный контроль	<0,200
Положительный контроль	>0,700

Если полученные значения вне ожидаемого диапазона, необходимо будет повторить анализ.

9.3 Интерпретация результатов

- Нерективные образцы должны рассматриваться как отрицательные к анти-хламидийным антителам IgG.
- Реактивные образцы должны рассматриваться как положительные к анти-хламидийным антителам IgG.
- Сомнительные образцы должны быть критически оценены или повторно проанализированы для подтверждения.

Взятия крови одного и того же пациента могут сравниваться только при проверке в одном анализе. В этом случае, 60 % вариация меры поглощения света во 2-м образце может рассматриваться как значительный указатель недавней или прогрессирующей инфекции. Если так, проведите анализ на специфические антитела IgA.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Диагностическая специфичность

Была определена на группе 263 образцов без иммунитета к инфекции хламидии IgG. Результат составил 99%.

10.2 Диагностическая чувствительность

Была определена на группе 104 образцов, инфицированных в прошлом хламидией IgG. Результат составил 93.2%.

10.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность может быть определена как способность анализа точно обнаруживать определенный анализ в присутствии потенциально интерферирующие факторы в основе образца. Контролируемые изучения потенциально интерферирующих материй показали, что на эффективность анализа не воздействуют антикоагулянты (ЭДТА и гепарин).

10.4 Точность

Точность была оценена на аппарате Radim, определяющим повторяемость и воспроизводимость анализа (вариативность в пределах и между анализами) на 3 сыворотках при разных концентрациях анти-хламидийного IgG .

Повторяемость (в пределах анализа)

Сыворотка	Средн.	± (S/CO)	CO	KB	Репликации, к-во
a	2.16	±	0.23	10.42	10
b	4.95	±	0.15	3.10	10
c	9.53	±	0.64	6.77	10

Воспроизводимость (в пределах анализа)

Сыворотка	Средн.	± (S/CO)	CO	KB	Репликации, к-во
a	3,69	±	0,46	12,40	10
b	2,26	±	0,31	13,60	10
c	1,24	±	0,14	11,40	10

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

В определении уровня иммунитета пациента против хламидии наличие антител класса IgG на любом уровне не исключает возможности прогрессирующей инфекции. Поэтому, проверка на специфическое антитело класса IgA важна для ранней диагностики острых инфекций. В случае болезни быстрее вмешательство значительно сократит риски. Однако результаты анализа должны тщательно интерпретироваться и подтверждаться клиническими оценками дальнейшими диагностическими испытаниями.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»

Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005, а/я 742

Тел.: (0342) 775122; Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.com