

Chlamydia pneumoniae - IgM - sELISA medac

Иммуноферментный анализ для определения IgM антител к *Chlamydia pneumoniae*.

Кат. № : 432/ТМБ

Только для диагностики in vitro.

Введение:

Хламидии - это грамотрицательные бактериальные патогены. Они имеют обязательный внутриклеточный жизненный цикл на слизистых поверхностях, эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках, и в соответствии с последними данными - в определенной тканной структуре центральной нервной системы. Хламидии зависят от богатых энергией фосфатов клеток хозяина и поэтому называются энергетическими паразитами.

Род хламидий включает 4 вида: *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci* и *C. pecorum*.

C. pneumoniae и *C. trachomatis* патогенны исключительно для человека. *C. psittaci* патогенна как для человека, так и для многих животных. *C. pecorum* до настоящего времени была выделена исключительно у животных.

Инфекция, вызываемая *C. pneumoniae* встречается во всем мире. Спектр заболеваний, вызванных *C. pneumoniae*, в дополнение к гриппоподобным, включает синуситы, фарингиты, бронхиты, хронические обструктивные легочные заболевания, пневмонии и реактивные артриты. Роль *C. pneumoniae* в этиологии инфекционной астмы, саркоидоза, рака легкого, атеросклероза, острого инфаркта миокарда, инсульта, рассеянного склероза и болезни Альцгеймера продолжает активно изучаться.

По мнению Grayston и Saikku, первых, описавших данный вид хламидий, практически каждый человек инфицируется и реинфицируется *C. pneumoniae* в течение своей жизни. Диагностика инфекции, вызываемой *C. pneumoniae* затруднена вследствие довольно слабой и / или рассеянной симптоматики; недиагностированная инфекция может принять хроническое течение и привести к серьезным последствиям.

Распространенность инфекции, вызванной *C. pneumoniae* составляет менее 10% у детей дошкольного возраста, достигает 50% у 20-летних, и 80-100% у 70-летних.

Инфекцию *C. pneumoniae* лабораторно можно определить такими методами как культуральный, ИФА, РИФ, ПЦР и ЛЦР.

Выделение патогена из клеточной культуры достаточно трудоемкий процесс, длительный по времени и дорогостоящий, и не всегда успешный. Метод прямой иммунофлюоресценции используется не часто, т.к. демонстрирует низкую чувствительность и специфичность. Коммерческие методы ПЦР или ЛЦР в настоящее время не всегда доступны.

Недостатки культурального и других методов диагностики хламидийной инфекции делают серологический метод методом выбора. Определение видоспецифических антител методом микроиммунофлюоресценции было признано "золотым стандартом". Данный метод трудоемок, субъективен и требует большого опыта. Эта тест-система не стандартизирована; использование различных антигенов и различных критериев Cut-off для прошедшей, свежей или текущей инфекции приводит к значительному разбросу результатов.

В тест-системах **Chlamydia pneumoniae - sELISA medac** использован высокоочищенный и специфичный антиген. Определение IgM, IgA и IgG антител позволяет оценить инфекционный статус и проводить адекватную терапию.

Тест-системы **Chlamydia pneumoniae - sELISA medac** отвечают всем необходимым требованиям для стандартизации, объективности, воспроизводимости и автоматизации в рутинных лабораторных исследованиях.

В добавление к **Chlamydiae pneumoniae - IgM-sELISA medac**

Кат.№: 432/ТМБ на 96 определений

предлагаются также следующие тест-наборы:

Chlamydiae pneumoniae - IgG-sELISA medac

Кат.№: 430/ТМБ на 96 определений,

Chlamydiae pneumoniae - IgA-sELISA medac

Кат.№: 431/ТМБ на 96 определений,

Chlamydiae trachomatis - IgG-pELISA medac

Кат.№: 497/ТМБ на 96 определений,

Chlamydiae trachomatis - IgA-pELISA medac

Кат.№: 498/ТМБ на 96 определений,

Chlamydiae - IgG-rELISA medac

Кат.№: 480/ТМБ на 96 определений,

Chlamydiae - IgA-rELISA medac

Кат.№: 490/ТМБ на 96 определений,

Chlamydiae - IgM-rELISA medac

Кат.№: 485/ТМБ на 96 определений,

cHSP60-IgG-ELISA medac

Кат.№: 435 на 96 определений.

Принцип теста

1. Планшета, покрытая высокоочищенным *C. pneumoniae*-специфичным антигеном.
2. Специфичные к *C. pneumoniae* антитела из образца сыворотки связываются с антигеном.
3. Конъюгированные пероксидазой античеловеческие IgM антитела связываются с IgM антителами.
4. Инкубация с ТМБ субстратом. Реакция останавливается добавлением стоп раствора. Результат считывается фотометрически.

Преимущества теста

- Высокая чувствительность и специфичность.
- Ломающиеся микролуночные стрипы позволяют эффективно использовать тест-систему.

Содержание набора

Кат. № 432/ТМБ

1. Микропланшета: стрипы 12x8 лунок, маркированные розовым (с рамкой и влагопоглотителем в вакуумной алюминиевой упаковке), ломающиеся, U-образной формы, покрытые *C. pneumoniae*-специфичным антигеном и FCS, готовы к использованию.
2. Отрицательный контроль: 1 флакон 1.5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, синего цвета, содержит NBCS, фенол, ПроКлин 300 и гентамицина сульфат.
3. Положительный контроль: 1 флакон 1.5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, синего цвета, содержит BSA, фенол, ПроКлин 300 и гентамицина сульфат.
4. Промывочный буфер: 1 флакон 100 мл PBS/Tween (x10), pH 7,2-7,4, содержит ПроКлин 300.
5. Разбавитель образцов: 1 флакон 110 мл PBS/Tween/NBCS, pH 7,0-7,2, готов к

использованию, синего цвета, содержит ПроКлин 300.

6. Конъюгат: 3 флакона по 5,0 мл каждый, козии античеловеческие IgM, HRP-конъюгированные, готов к использованию, красного цвета, содержит BSA, фенол, ПроКлин 300 и гентамицина сульфат.
7. ТМБ -субстрат: 1 флакон 10 мл, готов к использованию.
8. Стоп-раствор: 2 флакона по 11 мл каждый, готов к использованию.
9. IgG/РФ- абсорбент: 1 флакон 4 мл, козии античеловеческие IgG антитела, готов к использованию, содержит < 0,1% азида натрия.

1. Условия хранения и стабильность

Материал/реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Тест-набор	закрытый	2...8 °С	до истечения срока годности
Микропланшета	открытая	2...8° С в пакете с влажной прокладкой	12 недель
Контроли	открытые	2...8° С	12 недель
Промывочный буфер	разведенный	2...8° С	12 недель
Растворитель образцов	открытый	2...8° С	12 недель
Конъюгат	открытый	2...8° С	12 недель
ТМБ-субстрат	открытый	2...8° С	12 недель
Стоп-раствор	открытый	2...8° С	до истечения срока годности
IgG/РФ-абсорбент	открытый	2...8° С	12 недель

Не использовать реагенты с истекшим сроком годности!

2. Дополнительно необходимые реагенты и материалы

- 2.1 Вода для инъекций. Использование деионизированной воды может привести к ошибкам в процедуре теста.
- 2.2 Микропипетки с изменяемым объемом.
- 2.3 Чистые стеклянные или пластиковые сосуды для приготовления моющего буфера и образцов.
- 2.4 Необходимое оборудование для промывки микропланшеты (мультистеппер или микропланшетный вошер).
- 2.5 37° С- инкубатор.
- 2.6 Микроплащечный ридер с фильтрами 450 нм и 620 - 650 нм.

3. Подготовка реагентов

Рекомендуется начинать работу по достижении всеми компонентами теста комнатной температуры во избежание образования конденсата.

Определите количество лунок, необходимых для работы.

3.1. Микропланшета

Рекомендуется герметично запаковывать пакеты из фольги после изъятия необходимого количества лунок вместе с влажной прокладкой. Стабильность стрипов, хранящихся должным образом, приведена в таблице 1.

3.2. Промывочный буфер

Смешать одну часть промывочного буфера с 9-ю частями воды для инъекций (например, 50 мл промывочного буфера (x 10) с 450 мл воды). 10 мл приготовленного промывочного буфера необходимо для промывания 8 лунок.

Кристаллы, образовавшиеся в промывочном буфере, растворяются при температуре 37° С и/или при встряхивании при комнатной температуре.

Не смешивайте компоненты из наборов разных серий или наборов разных производителей!

Надежные и воспроизводимые результаты могут быть достигнуты только при тщательном соблюдении инструкции и правильном использовании реагентов.

4. Подготовка образцов

- 4.1. В тесте используются образцы **сыворотки**, но не плазма.
- 4.2. Предварительная обработка образцов, т.е. инактивация, необязательна. Образцы не должны быть контаминированы микроорганизмами и не должны содержать красные кровяные тельца.
- 4.3. Чтобы избежать интерференции с высоким титром IgG и ревматоидными факторами (РФ) необходимо выполнить абсорбцию IgG/РФ.

5. Процедура теста

5.A. IgG/РФ- абсорбция

Внимание!

Контроли готовы к использованию.

Нижеприведенные объемы рассчитаны только для одного исследования.

5.A.1. Сыворотка: 10 мкл сыворотки разводятся с 240 мкл разбавителя образцов (разведение 1:25).
 5.A.2. Абсорбция: 30 мкл IgG/ПФ- абсорбента и 30 мкл разведенной сыворотки смешиваются (разведение 1:50) и инкубируются 15 минут при комнатной температуре.

Альтернатива: абсорбция может происходить в течение всей ночи при температуре 2 - 8° С.

5.A.3. Теперь тестовое разведение составляет 1:50.

5.Б. Процедура теста

5.Б.1. Разрежьте алюминиевый пакет выше "застежки - молнии" и достаньте необходимое количество стрипов (см. Пункт 3.1).

Стрипы готовы к использованию, нет необходимости в предварительной промывке лунок.

5.Б.2. Раскапайте 50 мкл растворителя образцов в лунку А1 (бланк), по 50 мкл отрицательного контроля (в дубле) и 50 мкл положительного контроля и разбавленные образцы сыворотки пациентов.

Если необходимо, стрипы могут храниться до 30 минут во влажной камере при комнатной температуре до начала процедуры.

5.Б.3. Инкубировать стрипы 60 минут (\pm 5 мин.) при температуре 37° С (\pm 1° С) во влажной камере или заклеенными инкубационной пленкой.

5.Б.4. После инкубации промыть стрипы 3 раза 200 мкл промывочного буфера на каждую лунку. Следите за тем, чтобы все лунки при промывании были заполнены. После промывания вытряхнуть стрипы на фильтровальную бумагу.

Не позволяйте лункам высохнуть! Незамедлительно использовать!

5.Б.5. Добавьте конъюгат (окрашенный в красный) в каждую лунку.

50 мкл конъюгата пипетируется в каждую лунку если процедура теста проводится в ручную.

Пожалуйста помните: при работе на автоматическом приборе (имеется ввиду полный автомат) из-за большого испарения в инкубаторе прибора в каждую лунку должно быть пипетировано по 60 мкл конъюгата.

5.Б.6. Инкубировать стрипы как описано в пункте 5.3.

5.Б.7. После инкубации промыть стрипы как описано в пункте 5.Б.4.

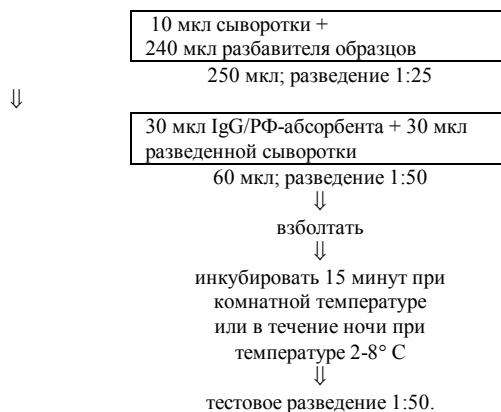
5.Б.8. Раскапать по 50 мкл ТМБ-субстрата в каждую лунку и инкубировать стрипы 30 минут (\pm 2 мин.) при температуре 37°С (\pm 1°С) во влажной камере или заклеенными инкубационной пленкой в темноте. Положительные образцы окрасятся в голубой цвет.

5.Б.9. Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку. Положительные образцы окрасятся в желтый цвет.

Перед фотометрическим считыванием протрите наружную поверхность дна лунок и проследите, чтобы в лунках отсутствовали пузырьки воздуха.

Считывание необходимо производить в течение 15 минут после добавления стоп-раствора!

5.С. Таблица IgG/ПФ- абсорбции



5.Д. Таблица рабочей процедуры теста

	Бланк (А1)	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Образец
Разбавитель образцов				
Отрицательный контроль	50 мкл	--	--	--
Положительный контроль	--	50 мкл	--	--
Образец абсорб.	--	--	50 мкл	--
	--	--	--	50 мкл

Инкубация 60 мин. при 37°С, промывание 3 x 200 мкл промывочного буфера.

Конъюгат	50/60 мкл*	50/60 мкл*	50/60 мкл*	50/60 мкл*
----------	------------	------------	------------	------------

Инкубация 60 мин. при 37°С, промывание 3 x 200 мкл промывочного буфера.

ТМБ-субстрат	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
--------------	--------	--------	--------	--------

Инкубация 30 мин. при 37°С в темноте.

Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------	---------	---------	---------	---------

Фотометрическое считывание при длине волны 450 нм (референс-значение 620-650 нм).

*ручная/автоматическая процедура.

6.А Валидность теста (расчет результатов)

Считайте значения ОП при длине волны 450 нм (референс-значение 620-650 нм).

Вычтите значение ОП бланка (лунка А1) из остальных значений ОП.

Значение бланка должно быть < **0.100**.

Среднее значение ОП отрицательного контроля должно быть < **0.100**.

Значение ОП положительного контроля должно быть > **0.800**.

Величина cut-off = Среднее значение ОП отриц. Контроля + 0.380.

Серая зона = cut-off \pm 10 %.

6.Б. Интерпретация результатов

6.Б.1. Качественная

Результат	Интерпретация
ОП < серая зона	Отрицательный
ОП cut-off +/- 10%	Сомнительный
ОП > серой зоны	Положительный

6.Б.2 Количественная

Индекс Cut-off: ОП образца ОП Cut-off	Интерпретация
< 0.9	Отрицательный
0.9 - 1.1	Сомнительный
> 1.1	Положительный

Образцы со значениями ОП в пределах серой зоны должны быть протестированы еще раз вместе со свежеполученными (через 14 дней) с целью выявления повышения или понижения титра.

Результаты исследования всегда должны сопоставляться с клиническими данными и дополнительными диагностическими параметрами. Высокая концентрация гемоглобина и билирубина в сыворотке не оказывают влияния на результат.

Однако, высокая концентрация липидов может увеличить значения ОП отрицательных образцов.

Перекрестная реактивность с антинуклеарными антителами, гетерофильскими антителами и антителами к *C. psittaci* и *C. trachomatis* не может быть исключена в некоторых индивидуальных случаях.

6.С. Интерпретация результатов определения IgM.

Возможные результаты	Интерпретация
+	Признак острой инфекции
+/-	IgM в серой зоне; Возможна очень ранняя стадия острой или текущая инфекция. Перепроверить IgM через 10-14 дней и проверить на IgA и IgG.
-	Отрицательный результат относительно анти- <i>Chlamydia pneumoniae</i> IgM антител. В случае клинического подозрения проверить на IgA и IgG.

7. Характеристики

7.А. Специфичность и чувствительность

Были исследованы 121 сыворотка IgM отрицательные (МИФ) к *C. pneumoniae* (31 пациент с клиническим подозрением на хламидийную инфекцию (1) и 90 пациентов с ЗППП культурально положительных к *C. trachomatis* (2)), также как 159 IgM-отрицательных сывороток (референс ИФА метод) от доноров крови (3) (мужчины и женщины от 20 до 60 лет) для определения специфичности. Для определения чувствительности были исследованы 38 сывороток от пациентов с респираторными инфекциями (4).

IgM- антитела к *C. pneumoniae* были определены методом МИФ во всех сыворотках.

Группы пациентов	Специфичность IgM
Сыворотки без IgM антител к <i>C. pneumoniae</i> (МИФ): (1) Пациенты с подозрением на хламидийную инфекцию (n = 31) (2) Пациенты с ЗППП (n = 90) <i>C. pneumoniae</i> IgM отрицательные сыворотки (референс ИФА метод): (3) Доноры крови (n = 159)	90% (28/31) 98% (88/90) 99% (157/159)
Группы пациентов	Чувствительность IgM
Сыворотки с IgM антителами к <i>C. pneumoniae</i> (МИФ): (4) Пациенты с респираторными инфекциями (n = 38)	97% (37/38)

7.Б. Воспроизводимость

Образцы	Внутригестовая вариабельность				Образцы	Внегестовая вариабельность (n = 11)		
	Средняя ОП	СО	КВ %	n		Средняя ОП	СО	КВ %
ОК	0,036	0,003	9	21	ОК	0,035	0,003	10
СПК	0,503	0,027	5	21	СПК	0,521	0,027	5
ПК	1,216	0,047	4	21	ПК	1,225	0,063	5
№ 1	0,844	0,063	7	21	№ 3	0,051	0,004	9
№ 2	0,719	0,042	6	21	№ 4	0,848	0,061	7

ОК-отрицательный контроль; СПК-слабо положительный контроль (не включен в набор); ПК-положительный контроль; СО-стандартные отклонения;

КВ %- коэффициент вариабельности.

Общие рекомендации

- Не путать флаконы и их крышки во избежание перекрестного загрязнения.
- Флаконы с реактивами после использования необходимо сразу же плотно закрыть, во избежание испарения и микробного заражения.
- После использования остатки реагентов хранить согласно предписаниям по хранению, чтобы обеспечить указанный срок годности.

- После использования все компоненты тест-набора должны храниться в оригинальной упаковке во избежание смешивания реагентов из разных тест-систем и партий.

Указания по безопасности

- Следует придерживаться предписаний по технике безопасности для лабораторий.
- Реактивы, произведенные из человеческих биоматериалов, были проверены на HBsAg, HCV, HIV 1 и 2 - антитела и классифицированы как неинфицированные. Однако рекомендуется обращаться с данным материалом как потенциально инфицированным, соблюдая необходимые меры предосторожности.