

cHSP60-IgG-ELISA medac
Рекомбинантный иммуноферментный тест-набор для
количественного определения IgG- антител к хламидийным белкам
теплового шока 60.

Номер по каталогу: 435

Только для in vitro диагностики

Введение

Белки теплового шока (HSP)- устойчивые клеточные стрессовые белки; их аминокислотный состав практически не меняется в течении развития, и они экспрессируют как в прокариотах, так и в эукариотах в определенной гомологичности. Так у людей и мышей HSP гомологичны на 99,9%; у людей и бактерий- 60%; у людей и хламидий около 50%, а между различными видами хламидий >95%.

Все белки теплового шока делятся на подгруппы, которые классифицируются в соответствии с их молекулярным весом: HSP10, HSP25(α В-кристаллин), HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 и HSP110. Все белки теплового шока делятся на две основные группы: *конститутивные* белки теплового шока (HSC) и *индуцируемые* белки теплового шока (HSP).

Под действием физиологических условий HSC постоянно продуцируются; они являются внутриклеточным составляющим на молекулярном уровне и отвечают за упорядочение анаболизма, метаболизма и катаболизма.

HSP (стрессовые белки) быстро синтезируются клетками в ответ на различные физические, химические и физиологические воздействия, для того, чтобы повысить функции защиты клетки.

Микробные HSP являются доминирующими антигенами и в иммуногенетике человека. В течение инфекционного процесса микроорганизмы значительно повышают синтез HSP для того, чтобы защититься от посторонних (внешних) иммунологических защитных механизмов. В этой связи HSP60 становятся одними из важнейших бактериальных белков. Иммуная защита, эффективная при первичной инфекции, обычно ограничивалась микробно-специфичными эпитопами HSP60 молекулы.

Недиагностированная или неэффективно леченная микробная инфекция может привести к хронической персистенции патогенов. На этой стадии происходит повышенная выработка как человеческих, так и микробных HSP, причем микробные HSP60 отвечают, в основном, за развитие иммунопатологических процессов. Антитела к сохранным эпитомам микробных HSP60 вступают в перекрестную реакцию с человеческими HSP60, которые в итоге приводят к аутоиммунным ответам.

Хроническая персистенция и/или реинфекция, бессимптомная или недиагностированная хламидийная инфекция приводит к постоянной или повторяющейся конфронтации между иммунной системой человека и хламидийными HSP60 (сHSP60). Иммуный ответ к устойчивым эпитомам хламидийных сHSP60 и параллельно к собственным HSP60-аутоиммунитетом, не может быть распознан без специфичной, стандартизованной системы определения.

Разнообразные иммунопатологические процессы и последствия (осложнения) хламидийных инфекций накладываются на сHSP60-индуцированные аутоиммунные процессы, среди которых такие, как: осложнения беременности, преждевременные роды, привычный и самопроизвольный аборт, эктопическая беременность, трубный фактор бесплодия и безуспешные попытки искусственного оплодотворения.

Аутоиммунные заболевания, такие как реактивные артриты и некоторые формы астмы, а возможно, и атеросклероз и коронарные болезни сердца могут возникать благодаря сенсibilизации к HSP60.

Для того, чтобы сделать определенные выводы из полученных результатов теста необходима стандартизованная, воспроизводимая, объективная тест-система.

В тест-системе сHSP60-IgG-ELISA medac как антиген использованы рекомбинантные белки теплового шока 60 (сHSP60) Chlamydia trachomatis. Тест-система предназначена для определения IgG- антител к HSP60- Chlamydia trachomatis. Ввиду того, что гомологичность между видами хламидий составляет >95%, данная тест-система определяет также антитела к HSP60 других видов хламидий.

Помимо тест-системы **cHSP60-IgG-ELISA medac**, Кат.№ 435, 96 тестов

мы также предлагаем **Chlamydia trachomatis-IgG-pELISA medac**

Кат.№ 497, 96 тестов

Chlamydia trachomatis-IgA-pELISA medac

Кат.№ 498, 96 тестов

Chlamydia pneumoniae-IgG-sELISA medac

Кат.№ 430, 96 тестов

Chlamydia pneumoniae-IgA-sELISA medac

Кат.№ 431, 96 тестов

Chlamydia pneumoniae-IgM-sELISA medac

Кат.№ 432, 96 тестов

Chlamydia-IgG-rELISA medac

Кат.№ 480, 96 тестов

Chlamydia-IgA-rELISA medac

Кат.№ 490, 96 тестов

Chlamydia-IgM-rELISA medac

Кат.№ 485, 96 тестов

Принцип теста

1. Планшета, покрытая рекомбинантными белками теплового шока 60, вырабатываемыми Chlamydia trachomatis (сHSP60).
2. Антитела из образцов, прямые к сHSP60, связываются с антигеном.
3. Конъюгированные пероксидазой античеловеческие IgG-антитела связываются с IgG антителами.
4. Инкубация с ТМВ-субстратом. Реакция останавливается добавлением стоп раствора. Считывание производится фотометрически.

Преимущества теста

1. Используются рекомбинантные белки теплового шока 60 как антиген.

2. Ломающиеся микролуночные стрипы позволяют эффективно использовать тест-систему.
3. Приспособлен для автоматической постановки на ИФА-спектрофотометре с открытой системой.

Содержание набора

Кат.№ 435/ТМБ.

1. **Микропланшета** 12 x 8 лунок (с рамкой в вакуумной алюминиевой упаковке), ломающиеся, U- образной формы, покрыты рекомбинантными белками теплового шока 60, выделенными из *Chlamydia trachomatis* и FCS, готова к использованию.
2. **Отрицательный контроль**, 1 флакон 1,5 мл, готов к использованию, окрашен в синий цвет, содержит NBCS, фенол, ПроКлин 300 и гентамицина сульфат.
3. **Положительный контроль**, 1 флакон 1,5 мл, , готов к использованию, окрашен в синий, содержит BSA, фенол, ПроКлин 300 и гентамицина сульфат.
4. **Моющий буфер**, 1 флакон 100 мл, PBS/Tween (10x), 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, окрашен в синий, содержит ПроКлин 300.
6. **Конъюгат**, 3 флакона по 4,5 мл каждый, козы античеловеческие IgG, HRP-конъюгированный, готов к использованию, окрашен в зеленый, содержит BSA, фенол, ПроКлин 300 и гентамицина сульфат.
7. **ТМВ-субстрат**, 1 флакон 10 мл, готов к использованию.
8. **Стоп-раствор**, 2 флакона по 11 мл каждый, готов к использованию.

1. Условия хранения и стабильность

Не использовать реагенты с истекшим сроком годности!

Материал/реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Тест-набор	закрытый	2...8°C	до истечения срока годности
Микропланшета	открытая	2...8°C в пакете с влажной прокладкой	12 недель
Контроли	открытые	2...8°C	12 недель
Моющий буфер	разведенный	2...8°C	12 недель
Разбавитель образцов	открытый	2...8°C	12 недель
Конъюгат	открытый	2...8°C	12 недель
ТМВ-субстрат	открытый	2...8°C	12 недель
Стоп-раствор	открытый	2...8°C	до истечения срока годности

2. Дополнительно необходимые материалы и реагенты

- 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°C- инкубатор.
- 2.6. Микроплащечный ридер с фильтрами на 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 пакет из фольги после изъятия необходимого количества лунок вместе с влажной прокладкой. Стабильность стрипов, хранящихся должным образом, приведена в таблице 1.

3.2. Моющий буфер

Смешать одну часть моющего буфера (10x) с девятью частями воды для инъекций (например, 50 мл моющего буфера с 450 мл воды). 10 мл моющего буфера необходимо для промывания 8 лунок.

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

Не смешивайте компоненты из наборов разных серий или 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**.
- 4.2. Предварительная обработка образцов, т.е. инактивация, необязательна. Однако, образцы не должны быть контаминированы микроорганизмами и не должны содержать красные кровяные тельца.
- 4.3. Образцы сыворотки должны быть разведены в пропорции 1:50 разбавителем образцов.

5.А. Процедура теста

5.1. Разрежьте алюминиевый пакет и достаньте необходимое количество стрипов.

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

5.2. Раскапайте 50 мкл **разбавителя образцов** в лунку А1 (бланк), по 50 мкл **отрицательного контроля** (в дубле), **положительного контроля** и разбавленные образцы сывороток пациентов.

При необходимости, стрипы могут храниться во влажной камере более 30 минут при комнатной температуре до начала процедуры теста.

5.3. Инкубировать стрипы 60 минут (± 5 мин.) при температуре 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) во влажной камере или заклеенными инкубационной пленкой.

5.4. После инкубации промыть стрипы 3 раза по 200 мкл **моющего 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!

5.5. Добавьте **конъюгат** (окрашен в зеленый) 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.

5.6. Инкубировать стрипы как описано в пункте 5.3.

5.7. После инкубации промыть стрипы как описано в пункте 5.4.

5.8. Раскапать по 50 мкл **ТМВ-субстрата** в каждую лунку и инкубировать стрипы 30 минут (± 2 мин.) при температуре 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) во влажной камере или заклеенными инкубационной пленкой в темноте. Положительные образцы окрасятся в синий цвет.

5.9. 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.Б. Таблица рабочей процедуры теста

	Бланк (А1)	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Образец
Разбавитель образцов	50 мкл	-	-	-
Отрицательный контроль	-	50 мкл	-	-
Положительный контроль	-	-	50 мкл	-
Образец	-	-	-	50 мкл
Инкубация 60 мин. при t 37°C, промывание 3x200 мкл моющего буфера.				
Конъюгат	50/60 мкл*	50/60 мкл*	50/60 мкл*	50/60 мкл*
Инкубация 60 мин. при t 37°C, промывание 3x200 мкл моющего буфера.				
ТМВ-субстрат	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Инкубация 30 мин. при t 37°C в темноте.				
Сток-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл

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

*ручная/автоматическая процедура.

6.А Вычисление результатов (Валидность теста)

- Считайте значения Оптической Плотности (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 Отрицательного Контроля должно быть **<0.100**.
- Значение ОП Положительного Контроля должно быть **>0.800**.
- **Величина Cut-off = среднее значение ОП Отрицательного Контроля + 0.350.**
- **Серая зона = Cut-off \pm 10%.**

6.Б. Интерпретация результатов

6.Б.1 Качественно:

Результат	Интерпретация
ОП < Серая зона	Отрицательный
ОП = Cut-off \pm 10%	Сомнительный
ОП > Серая зона	Положительный

- Положительный результат теста означает, что исследованная сыворотка содержит антитела, реагирующие с HSP60 от Chlamydia trachomatis.
- Высокая концентрация гемоглобина, билирубина и липидов в сыворотке не оказывает влияния на результат.

6.Б.2 Полуколичественно:

Индекс Cut-off = $\frac{\text{ОП образца}}{\text{Cut-off}}$	Интерпретация
< 0.9	Отрицательный

0.9 -1.1	Сомнительный
> 1.1	Положительный

6.Б.3 Количественно (Расчет титра)

В случае необходимости может быть рассчитан конечный титр.
Конечный титр (= последнее положительное или пограничное разведение).

Для этого необходимо рассчитать индекс Cut-off:

$$\text{Индекс Cut-off} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{Cut-off}}$$

Существует два способа расчета титра:

1. Соотношение 1: титр = 55.5 x (ОП/ Cut-off)

Результат должен быть округлен до первого нижнего полного значения титра, т.е. 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 и т.д.

Этот расчет действителен для значений ОП ≤ 2.0. Образцы со значениями

ОП >2.0 должны быть протестированы снова с большим начальным разведением (1:400).

Если использовалось начальное разведение больше, чем 1:50, вышеприведенная формула должна быть изменена в соответствии с фактором разведения.

Например: Образец был разведен в соотношении 1:400, это означает восьмикратное превышение начального разведения.

ОП = 1.78

Cut-off = 0.42

Соотношение 1: титр = 55.5 x (1.78/0.42) x 8 = 1882 ⇒ **1:1600**.

Титр, соответствующий индексу Cut-off также может быть определен по нижеприведенной таблице.

Индекс Cut-off	IgG	
	Результат	Титр
<0.90	Отрицательный	<1:50
0.90 - 1.10	Сомнительный	
1.11 - 1.80	Положительный	1:50
1.81 - 3.60	Положительный	1:100
3.61 - 7.20	Положительный	1:200

7. Представленные характеристики

См. Страницу 26 оригинальной инструкции.

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.