

Chlamydia pneumoniae - IgG – ELISA plus medac

Иммуноферментный анализ для количественного определения IgG антител к **Chlamydia pneumoniae**.

Кат. № : 430 - plus

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 добавление 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 настоящее время ИФА является основным методом в лабораторных рутинных исследованиях. Качество диагностической информации зависит от используемого антигена, а также от интерпретации полученных данных.

В тест-системах **Chlamydia pneumoniae -IgG- ELISA plus medac** использован высокоочищенный и специфичный антиген, также как и в **Chlamydia pneumoniae -IgA- ELISA plus medac**, и в **Chlamydiae pneumoniae - IgM-sELISA medac**.

Определение IgM, IgA и IgG антител позволяет оценить инфекционный статус и проводить адекватную терапию.

Более того, количественный расчет по одной точке (УЕ/мл) позволяет получить более воспроизводимые результаты.

В добавление к **Chlamydiae pneumoniae - IgG-ELISA plus medac**

Кат.№: 430- plus на 96 определений

предлагаются также следующие тест-наборы:

Chlamydiae pneumoniae - IgG-sELISA medac

Кат.№: 430/TMB на 96 определений,

Chlamydiae pneumoniae - IgA-ELISA plus medac

Кат.№: 431- plus на 96 определений,

Chlamydiae pneumoniae - IgA-sELISA medac

Кат.№: 431/TMB на 96 определений

Chlamydiae pneumoniae - IgM-sELISA medac

Кат.№: 432/TMB на 96 определений,

Chlamydiae trachomatis - IgG-pELISA medac

Кат.№: 497/TMB на 96 определений,

Chlamydiae trachomatis - IgG-ELISA plus medac

Кат.№: 497- plus на 96 определений,

Chlamydiae trachomatis - IgA-pELISA medac

Кат.№: 498/TMB на 96 определений,

Chlamydiae trachomatis - IgA-ELISA plus medac

Кат.№: 498- plus на 96 определений,

Chlamydiae - IgG-rELISA medac

Кат.№: 480/TMB на 96 определений,

Chlamydiae - IgA-rELISA medac

Кат.№: 490/TMB на 96 определений,

Chlamydiae - IgM-rELISA medac

Кат.№: 485/TMB на 96 определений,

cHSP60-IgG-ELISA medac

Кат.№: 435 на 96 определений.

Принцип теста

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

Преимущества теста

- Высокая чувствительность и специфичность.
- Количественный расчет по одной точке, не требуется стандартная кривая.
- Ломающиеся микролуночные стрипы позволяют эффективно использовать тест-систему.

Содержание набора

Кат. № 430- plus

1. Микропланшета: стрипы 12x8 лунок, маркированные розовым (с рамкой и влагопоглотителем в вакуумной алюминиевой упаковке), ломающиеся, U-образной формы, покрытые *S. pneumoniae*-специфичным антигеном и FCS, готовы к использованию.
2. Отрицательный контроль: 2 флакона по 0,75 мл каждый, человеческая сыворотка, готов к использованию, синего цвета, содержит NBCS, фенол, ПроКлин 300 и гентамицина сульфат.
3. Положительный контроль: 2 флакона по 0,75 мл каждый, человеческая сыворотка, готов к использованию, синего цвета, содержит BSA, фенол, ПроКлин 300 и гентамицина сульфат.
4. Калибратор: 2 флакона по 0,75 мл каждый, человеческая сыворотка, готов к использованию, синего цвета, содержит BSA, фенол, ПроКлин 300 и гентамицина сульфат.
5. Промывочный буфер: 1 флакон 100 мл PBS/Tween (x10), pH 7,2-7,4, содержит ПроКлин 300.
6. Разбавитель образцов: 1 флакон 110 мл PBS/Tween/NBCS, pH 7,0-7,2, готов к использованию, синего цвета, содержит ПроКлин 300.
7. Конъюгат: 4 флакона по 5,0 мл каждый, козьи античеловеческие IgG, HRP-конъюгированные, готов к использованию, желтого цвета, содержит BSA, фенол, ПроКлин 300 и гентамицина сульфат.
8. ТМБ -субстрат: 1 флакон 10 мл, готов к использованию.
9. Стоп-раствор: 2 флакона по 14 мл каждый, 0,5 М серной кислоты, Тритон X-100, готов к использованию.

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 влагопоглотителем	12 недель
Контроли/Калибратор	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

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 (10x) растворяются при температуре 37°C и/или при встряхивании при комнатной температуре.

Не смешивайте тест-специфичные компоненты (микропланшета, контроли, калибратор и конъюгат) из наборов разных серий. В противоположность этому, разбавитель образцов, промывочный буфер, ТМБ-субстрат и стоп-раствор могут взаимозаменяться во всех тест-наборах Медак для определения хламидий и микоплазмы. Реагенты других производителей не должны быть использованы в тесте.

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. Образцы сыворотки должны быть разведены в пропорции 1: 50 растворителем образцов.

5.А. Процедура теста

5.1. 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.

5.2. Раскапайте 50 мкл растворителя образцов в лунку A1 (бланк), по 50 мкл каждого отрицательного контроля и положительного контроля, разбавленные образцы сыворотки пациентов (для единичного определения) и 50 мкл калибратора (в дубле).

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

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

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

Не позволяйте лункам высохнуть! Незамедлительно использовать!

5.5. Добавьте конъюгат (окрашенный в желтый) 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 ТМБ-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 голубой 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 (A1)	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Калибратор	Образец
Разбавитель образцов	50 мкл	--	--	--	
Отрицательный контроль	--	50 мкл	--	--	
Положительный контроль	--	--	50 мкл	--	
Калибратор	--	--	--	50 мкл	
Образец					50 мкл

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

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

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

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

Инкубация 30 мин. при 37°C в темноте.

Стоп-раствор	100 мкл	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)

Оценка результатов представлена с использованием Условных Единиц (УЕ/мл).

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

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

* Лот-специфические данные:

Лист с лот-специфическими данными прилагается к каждому тест-набору и содержит следующую информацию:

- Лот-специфичную калибровочную кривую
- Параметры кривой а и b
- Номинальное значение ОП калибратора
- Нижнюю границу ОП калибратора
- Номинальное значение концентрации (УЕ/мл) Положительного контроля
-

* Критерии валидности

* ОП бланка должна быть **< 0,100**.

* ОП **отрицательного контроля** должно быть **< 0,100**.

* Единичное значение **положительного контроля** должно укладываться в номинальное значение, указанное в листе с лот-специфичными данными.

- Среднее значение ОП калибратора должно быть выше нижней границы, указанной в листе с лот-специфичными данными.

Если полученные результаты не укладываются в спецификацию, тест необходимо повторить.

- Коррекция результатов

Полученные значения ОП Положительного Контроля и образцов необходимо скорректировать с применением следующей формулы:

$$\text{ОП скоррект.} = \frac{\text{Номинальное значение ОП калибратора}}{\text{Полученное значение ОП калибратора}} \times \text{ОП полученн.}$$

- Расчет результатов

Соответствующие концентрации скорректированных значений ОП в УЕ/мл могут быть считаны с лот-специфичной калибровочной кривой (на листе с лот-специфичными данными).

Альтернативно, концентрации можно рассчитать по следующей формуле:

$$\text{Концентрация (УЕ/мл)} = b / \left(\frac{a}{\text{ОП скоррек.}} - 1 \right)$$

Большинство современных ИФА ридеров позволяют запрограммировать формулу для автоматического расчета данных.

Измеряемые значения - от 22 до 200 УЕ/мл. Образцы со значениями ниже интерпретируются как < 22 УЕ/мл, а со значениями выше – как > 200 УЕ/мл.

Такие значения не должны экстраполироваться.

Cut-off = 25 УЕ/мл

Серая зона = 22 – 28 УЕ/мл.

6Б. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ/ ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА:

*Пробы со значениями УЕ ниже нижней границы серой зоны, оцениваются как **отрицательные**.

*Пробы со значениями УЕ в пределах серой зоны оцениваются как **неопределенные**.

Они должны быть повторно протестированы параллельно со свежими образцами, взятыми через 14 дней для того, чтобы определить изменение титра.

*Пробы со значениями УЕ выше верхней границы серой зоны, оцениваются как **положительные**.

Результаты теста всегда следует интерпретировать вместе с клинической картиной и с другими возможными диагностическими параметрами. Высокое содержание гемоглобина, билирубина и липидов в сыворотке не влияет на результаты.

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

6 В. СПЕЦИФИЧНАЯ IgM-/IgA-/IgG- ИНТЕРПРЕТАЦИЯ.

Возможные результаты			Интерпретация
IgM COI ¹	IgA УЕ/мл	IgG УЕ/мл	
>1,1	< 22	< 22	1. Серологическая картина ранней стадии инфекции или стимуляция поликлональных В-клеток. Протестировать IgM, IgA и IgG через 14 дней.
<0,9	> 28	< 22	2. Серологическая картина ранней стадии инфекции или персистенции только IgA*. Протестировать IgM, IgA и IgG через 14 дней.
>1,1	> 28	< 22	3. Серологическая картина острой инфекции. Протестировать IgG через 14 дней.
>1,1	< 22	> 28	4. Серологическая картина острой инфекции.
>1,1	> 28	> 28	5. Серологическая картина острой инфекции.
<0,9	> 28	> 28	6. Серологическая картина текущей инфекции#. Протестировать IgA и IgG через 14 дней.
<0,9	< 22	> 28	7. Серологическая картина прошедшей инфекции. В случае клинического подозрения протестировать снова через 14 дней для выявления изменения количества IgA и IgG антител.
<0,9	< 22	< 22	8. Отсутствие серологической картины текущей или прошедшей инфекции†. В случае клинического подозрения протестировать снова через 14 дней для выявления изменения количества IgM, IgA и IgG антител.

¹ COI - Cut-off индекс

* В некоторых случаях IgA антитела могут персистировать. Этот иммунологический феномен проявляется при различных бактериологических инфекциях.

Текущая инфекция может означать:

- хроническую инфекцию с персистенцией патогенов: единичное значение антител остается постоянным в течение нескольких недель.
- Острую инфекцию: единичное значение антител возрастает. Двукратное возрастание единичного значения является статистически значимым.
- Высокая концентрация IgG : не может быть исключена при острой инфекции.

† В случае свежей острой инфекции серологические результаты определения антител могут быть отрицательными независимо от клинической картины, а определение антигена – положительным. Если положительный результат определения антигена подтверждается серологически, рекомендуется повторить тест через 14 дней с вновь взятым образцом сыворотки для определения сероконверсии.

Комментарий:

Результаты, находящиеся в серой зоне, могут отражать начинающуюся или затухающую инфекцию. Рекомендуется повторить тест через 14 дней с вновь взятым образцом сыворотки.

7. ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

7.A. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ:

Было исследовано 303 образца в сравнении с *Chlamydia pneumoniae*-IgG-sELISA medac.

Результаты представлены в нижеследующей таблице:

	Chlamydia pneumoniae-IgG-sELISA medac			
		отрицательный	Серая зона	положительный
C. pneumoniae-IgG -ELISA plus medac	отрицательный	85	0	0
	Серая зона	1	8	0
	положительный	0	3	206

Чувствительность = 100%

Специфичность = 99%

Соответствие =99%

7. Б. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ:

Образцы	Отклонения в наборе				Образцы	Отклонения в партии (n =11)		
	УЕ/мл	СО	КВ	N		Средн. ОП	СД	КВ%
ПК	57,5	3,5	6,1	21	ПК	52,1	3,4	6,4
1	16,2	0,7	4,6	21	5	16,4	1,2	7,4
2	57,9	5,5	9,4	21	6	55,4	4,1	7,5
3	96,5	8,0	8,3	21	7	93,9	9,8	10,4
4	135,7	13,9	10,2	21	8	130,9	14,7	11,3

УЕ/мл- условные единицы /мл

ПК – положительный контроль

СО – стандартные отклонения

КВ – коэффициент вариабильности

ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

* Не путать флаконы с реактивами 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.

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.