

Chlamidia trachomatis IgG –ELISA plus medac
Иммуноферментный метод для количественного определения
IgG - антител к Chlamidia trachomatis.

Кат. № : 497-plus

Только для диагностики in vitro.

Введение

Хламидии – грам - отрицательные бактериальные патогены. Они имеют обязательный внутриклеточный жизненный цикл на слизистых поверхностях и в соответствии с последними данными – в эндотелиальных клетках и гладкомышечных клетках.

Хламидии зависят от богатых энергией фосфатов клеток хозяина и поэтому называются энергетическими паразитами.

Род хламидий включает 4 вида: **Chlamidia pneumoniae**, **Chlamidia psitaci**, **Chlamidia pecorum** и **Chlamidia trachomatis**.

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

Chlamidia trachomatis является наиболее частым возбудителем инфекций урогенитального тракта, передаваемых половым путем, а также глаз. Во время родов **Chlamidia trachomatis** может передаваться новорожденному, вызывая неонатальные конъюнктивиты и пневмонии.

Chlamidia trachomatis подразделяется на 19 сероваров, вызывающих заболевания с различными клиническими проявлениями. Серовары А-С являются причиной эндемической трахомы (заболевание глаз, которое может привести к слепоте), поражающей сотни миллионов людей в развивающихся странах. Венерический лимфогранулематоз, тропическое заболевание, передаваемое половым путем, является результатом инфицирования серотипами L1-L3. В промышленных странах серотипы D-K вызывают наиболее частые оculo-генитальные инфекции, передаваемые половым путем.

Инфекция, вызываемая **Chlamidia trachomatis** у женщин в основном протекает бессимптомно, что приводит ко многим хроническим заболеваниям, обусловленным восходящей персистирующей инфекцией.

Первоначальным местом инфицирования **Chlamidia trachomatis** является шейка матки с клиническими проявлениями цервицита. Уретриты у женщин возникают намного реже. Между первичным инфицированием и началом хронизации процесса могут пройти месяцы и даже годы.

Бессимптомная инфекция **Chlamidia trachomatis** у женщин может привести к эндометритам, аднекситам, периаппендицитам, перигепатитам, перитонитам и реактивным артритам. Повторные аднекситы могут быть причиной вторичного бесплодия. У мужчин восходящая инфекция вслед за бессимптомным уретритом приводит к эпидидимитам и простатитам.

Влияние на репродуктивную функцию в настоящее время дискутируется. Известны также постуретральные реактивные артриты у мужчин.

Периферическую инфекцию **Chlamidia trachomatis** лабораторно можно определить такими высокочувствительными и высокоспецифическими методами как ИФА, РИФ, ПЦР, ЛЦР. Два последних высокочувствительных метода (ПЦР и ЛЦР) используются также для определения возбудителей в эякуляте. Наличие в ПЦР/ЛЦР ингибиторов часто приводит к ложноотрицательным результатам. Классическое выделение возбудителей из клеточной культуры проблематично вследствие наличия токсических веществ в семени. Возможно получение ложно отрицательных результатов. Возможность определения секреторного IgA к *S. trachomatis* в семенной плазме позволяет преодолеть этот диагностический недостаток. При первичном иммунном ответе на контакт с возбудителем слизистая оболочка гениталий продуцирует *S. trachomatis* специфические секреторные IgA. В некоторых случаях секреторные IgA проявляются как результат местного иммунного ответа и свидетельствуют только о местном, ограниченном процессе. Обнаружение сывороточных антител свидетельствует уже о системном распространении инфекции (диссеминация). Однако нераспознанная или недостаточно леченная хламидийная инфекция часто приводит к хронизации процесса, обусловленной восходящей персистирующей **Chlamidia trachomatis**.

Хламидии содержат общие иммунодоминантные антигены такой как родоспецифический липополисахарид. Для видоспецифического серологического исследования **Chlamidia trachomatis** необходимо задействовать соответствующие иммуногенные структуры, расположенные в вариабельных доменах основного белка наружной мембраны (MOMP – Major Outer Membrane Protein).

До сих пор реакция микроиммунофлюоресценции (РИФ) считалась т.н. "золотым стандартом" видоспецифической серологии. В основе РИФ лежит использование очищенных неподвижных целых элементарных телец. Поэтому не может быть исключена перекрестная реакция между видами.

Тест **Chl.trachomatis-IgG-ELISA plus medac** использует синтетический пептид из иммунодоминантной области MOMP. Данный высокоспецифичный антиген используется также в наборе **Chl.trachomatis-IgA -ELISA plus medac**. Определение IgA и IgG антител к **Chlamidia trachomatis** позволяет классифицировать стадию инфекции.

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

Помимо **Chlamidia trachomatis-IgG-ELISA plus medac**
Кат.номер: 497-plus , 96 определений

Предлагаются **Chlamidia trachomatis-IgG-pELISA medac**
Кат.номер: 497/TMB , 96 определений
Chlamidia trachomatis-IgA-ELISA plus medac
Кат.номер: 498-plus , 96 определений
Chlamidia trachomatis-IgA-pELISA medac
Кат.номер: 498/TMB , 96 определений
Chlamydia pneumoniae – IgG- sELISA medac
Кат.номер: 430/TMB , 96 определений
Chlamydia pneumoniae – IgG- ELISA plus medac
Кат.номер: 430- plus, 96 определений
Chlamydia pneumoniae – IgA- sELISA medac
Кат.номер: 431/TMB , 96 определений
Chlamydia pneumoniae – IgA- ELISA plus medac
Кат.номер: 431- plus, 96 определений
Chlamydia pneumoniae – IgM- sELISA medac
Кат.номер: 432/TMB , 96 определений
Chlamidia-IgG-rELISA medac
Кат.номер: 480/TMB , 96 определений
Chlamidia-IgA-rELISA medac
Кат.номер: 490/TMB , 96 определений
Chlamidia-IgM-rELISA medac
Кат.номер: 485/TMB , 96 определений
cHSP60-IgG-ELISA medac
Кат.номер: 435, 96 определений

Принцип теста

Планшета покрытая **Chlamidia trachomatis**- специфичным синтетическим пептидом;

Chlamidia trachomatis-специфичные антитела из проб пациентов связываются с антигеном;

Конъюгированные с пероксидазой анти - человеческие IgA - антитела связываются с **Chlamidia trachomatis**-специфичными IgA антителами; Инкубация с ТМВ-субстратом. Реакция останавливается добавлением стоп раствора. Абсорбция определяется фотометрически.

Преимущества теста

- Отсутствие ложноположительных результатов, обусловленных межвидовой перекрестной реакцией хламидий;
- Расчет по одной точке, не требуется построение стандартной кривой;
- Наличие стрипов позволяет экономичное использование теста;

СОДЕРЖИМОЕ УПАКОВКИ

Кат №: 497-plus

1. **Микропланшета:** 12 стрипов по 8 лунок, маркированы фиолетовым цветом, (с рамкой и влагопоглощающей прокладкой), ломающиеся, U-образной формы, покрыты **Chlamidia trachomatis**-специфичным, синтетическим пептидом и NBCS. Готов к использованию.

2. **Отрицательный контроль:** 1 флакон по 1,5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, окрашен в голубой цвет, содержит NBCS, фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат;

3. **Положительный контроль:** 1 флакон по 1,5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, окрашен в голубой цвет, содержит BSA, фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат;

4. **Калибратор:** 1 флакон по 1,5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, окрашен в голубой цвет, содержит BSA, фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат;

5. **Концентрат моющего буфера:** 1 флакон 100 мл, PBS/Твин(10X), pH 7.2-7.4, содержит Проклин 300.

6. **Буфер для разведения проб:** 1 флакон 110 мл, PBS/Tween/NBCS, pH 7.0- 7.2, готов к использованию, окрашен в голубой цвет, содержит Проклин 300.

7. **Конъюгат:** 3 флакона по 4,5 мл каждый, козы анти - человеческий IgG, конъюгированный HRP, готов к использованию, окрашенный в жёлтый цвет, содержит BSA, фенол, ProClin TM 300 и сульфат гентамицина;

8. **ТМВ-субстрат:** 1 флакон 10 мл, готов к использованию.

9. **Стоп - раствор:** 2 флакона по 11 мл каждый, Тритон X-100, готов к использованию.

1. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ:

Материал/реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Тест - упаковка	не открытая	2...8 С	до истечения срока годности
Микро планшеты с антигенным покрытием	открытые	2...8 С закрытые в алюминиевый пакет с влагопоглотителем	12 недель
Контроли/Калибратор	открытые	2...8 С	12 недель
Моющий буфер	разведенный	2...8 С	12 недель
Буфер для разведения проб	открытый	2...8 С	12 недель
Конъюгат	открытый	2...8 С	12 недель
ТМВ-субстрат	открытый	2...8 С	12 недель
Стоп - раствор	открытый	2...8 С	до истечения срока годности

Нельзя использовать наборы с истекшим сроком годности.

2. ДОПОЛНИТЕЛЬНО НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

2.1. Aqua ad injectabilia (бидистиллированная вода). Использование деионизированной воды может привести к ошибкам при проведении 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 микропланшет (мультистеппер или микропланшетный вошер).

2.5. 37°C - инкубатор.

2.6. Микроплащечный ридер (фотометр) с фильтрами 450 нм и 620-650 нм.

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ:

Во избежание появления конденсата необходимо, чтобы до начала процедуры все компоненты набора были доведены до комнатной температуры.

Расчитать необходимое количество стрипов.

3.1. Микропланшета:

После каждого изъятия стрипов алюминиевый пакет должен плотно закрываться вместе с влагопоглощающей прокладкой. Срок годности и условия хранения указаны в п.1.

3.2. Моющий буфер :

Смешать одну часть концентрата моющего буфера (10X) с девятью частями бидистиллированной воды (например, 50 мл. концентрата моющего буфера (10X) – с 450 мл. бидистиллированной воды). На каждый стрип необходимо 10 мл разведенного моющего буфера.

Кристаллы концентрата моющего буфера (10X) растворяются при нагревании (макс. 37° С) и/или встряхивании при комнатной температуре.

Не смешивать тест-специфичные реагенты (микропланшета, контроли, конъюгат) одной партии с реагентами других партий. В противоположность этому, разбавитель образцов, моющий буфер, ТМВ-субстрат и стоп-раствор взаимозаменяемы во всех наборах Медак для определения Хламидий и микоплазмы. Не используйте реагенты других производителей. Валидные и воспроизводимые результаты получаются, если процедура теста выполняется точно и используются реагенты из данного набора.

4. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ:

- 4.1. Вид исследуемого материала: сыворотка.
- 4.2. Сыворотка не требует специальной инактивации. Однако она не должна быть контаминирована микроорганизмами или содержать эритроциты.
- 4.3. Сыворотки должны быть разведены 1: 50 буфером разведения проб.

5А. ПРЕДПИСАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ТЕСТА:

- 5.1. Упаковку планшета вскрыть по линии вскрытия и взять необходимое количество стрипов (см. 3.1.).
Микроланшет готов к использованию и не требует предварительной отмывки.
- 5.2. Внести 50 мкл разводящего буфера в лунку А1, используемую в качестве бланка (см. 6.А.), и по 50 мкл отрицательного и положительного контроля и разведенной сыворотки пациента, и по 50 мкл калибратора в дубле.

При необходимости, до использования, микропланшету можно хранить во влажной камере до 30 минут при комнатной температуре.

- 5.3. Стрипы инкубировать в течение 60 мин (± 5 мин) при температуре 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) во влажной камере или заклеенными инкубационной пленкой.
- 5.4. После инкубации промыть стрипы три раза 200 мкл моющего буфера на каждую лунку. Следить за тем, чтобы все лунки при промывке были заполнены.
 После окончания процесса отмывки вытряхнуть стрипы на фильтровальную бумагу.

Не позволяйте лункам высохнуть! Незамедлительно использовать!

- 5.5. Добавить 50 мкл. конъюгата (жёлтого цвета) во все лунки (если процедура проводится в ручную).

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

- 5.6. Инкубировать в течение 60 мин. (± 2 мин.) при температуре 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) во влажной камере или заклеенными в инкубационную пленку.
- 5.7. После инкубации снова промыть микрострипы (см. п. 5.4).
- 5.8. Добавить во все лунки 50 мкл. ТМВ-субстрата и инкубировать в течение 30 минут (± 2 мин) при температуре 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) во влажной камере или заклеенными в инкубационную фольгу в темноте. Положительные пробы приобретут голубой цвет.
- 5.9. Добавить 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку для остановки реакции. У положительных сывороток происходит смена окраски с голубого на желтый.

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

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

5 Б. ТАБЛИЦА РАБОЧЕЙ ПРОЦЕДУРЫ:

	Бланк (А1)	Негативный контроль	Позитивный контроль	Калибратор	Сыворотка пациентов
Буфер для разведения проб	50 мкл.	-	-	-	-
Отрицательный контроль	-	50 мкл.	-	-	-
Положительный контроль	-	-	50 мкл	-	-
Калибратор	-	-	-	50 мкл	-
Сыворотка пациентов	-	-	-	-	50 мкл.
Инкубировать в течение 60 минут при температуре 37°C , 3 раза промыть моющим буфером 200 мкл/на лунку.					
Конъюгат	50/60* мкл	50/60* мкл	50/60* мкл	50/60* мкл	50/60* мкл
Инкубировать в течение 60 минут при температуре 37°C , 3 раза промыть моющим буфером 200 мкл/на лунку.					
ТМВ-субстрат	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C в темноте.					
Стоп - раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Фотометрическое считывание при 450 нм (референс 620 - 630 нм.)					

* ручная/автоматическая процедура (см. п. 5.б.)

6А. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА:

* Результаты оцениваются в Условных Единицах (УЕ/мл).

* Фотометрическое считывание осуществляется при длине волны 450 нм (референс-длина волны (ОП) 620 - 650 нм.).

*Значение оптической плотности бланка (лунка А1) вычитается из всех других значений оптической плотности на планшете.

* 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:

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

- 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.

6 В. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG/IgA В СЫВОРОТКЕ.

Возможные результаты IgA УЕ/мл		Интерпретация
> 28	< 22	1. Серологическая картина ранней стадии инфекции или персистенции IgA*. Протестировать IgA и IgG через 14 дней.
> 28	> 28	2. Серологическая картина текущей инфекции. Протестировать IgA и IgG через 14 дней.
< 22	> 28	3. Серологическая картина прошедшей инфекции #. В случае клинического подозрения протестировать IgA и IgG через 14 дней.
< 22	< 22	4. Нет серологического подтверждения текущей или прошедшей инфекции †. В случае клинического подозрения протестировать IgA и IgG через 14 дней.

* 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.

† 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.А. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ:

Было исследовано 327 образцов в сравнении с Chlamydia trachomatis-IgG-pELISA medac.

Результаты представлены в нижеследующей таблице:

C. trachomatis-IgG-ELISA plus medac	C. trachomatis-IgG-pELISA medac			
		отрицательный	Серая зона	положительный
	отрицательный	172	5	2
	Серая зона	4	8	6
положительный	2	0	128	

Чувствительность = 94%

Специфичность = 97%

Соответствие =94%

7. Б. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ:

Образцы	Отклонения в наборе				Образцы	Отклонения в партии (n =11)		
	УЕ/мл	СО	КВ	N		Средн. ОП	СД	КВ%
ПК	41,1	1,0	2,4	22	ПК	40,5	1,4	3,5
1	4,8	0,3	7,0	22	5	9,2	0,4	4,6
2	50,7	2,5	5,0	22	6	49,8	1,6	3,1
3	90,1	4,2	4,6	22	7	97,0	4,1	4,2
4	109,7	5,4	4,9	22	8	151,3	9,2	6,1

УЕ/мл- условные единицы /мл

ПК – положительный контроль

СО – стандартные отклонения

КВ – коэффициент вариальности

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.