

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ IGG-АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ НЕМАТОД В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «Нематоды IgG-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления IgG антител к антигенам нематод в сыворотке (плазме) крови «Нематоды IgG-ИФА» предназначен для качественного выявления IgG-антител к антигенам аскарид и токсокар класса нематод в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Выявление IgG-антител к нематодам основано на использовании непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизован антиген. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с субстратным раствором тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации специфических IgG-антител к нематодам. Содержание IgG-антител к нематодам в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Использование высокоочищенного препарата позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания нематод в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «Нематоды IgG-ИФА» не превышает 8.0%.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	R174Z	Планшет 96-луночный полистироловый, стриптированный, готов к использованию	1	шт	-
2	CN174Z CP174Z	Контрольные сыворотки на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgG-антител к нематодам, готовы к использованию (2 мл)	2	шт	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
3	T174XZ	Концентрат конъюгата (1.2 мл)	1	шт	прозрачная жидкость красного цвета
4	ST174Z	Буфер для разведения концентрата конъюгата, готов к использованию (12 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
5	S011Z4	ИФА-Буфер , готов к использованию (100 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
6	R055Z	Субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
7	S008Z	Концентрат отмычного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26х-кратный (22 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
8	R050Z	Стоп-реагент , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
9	N003	Бумага для заклеивания планшета	2	шт	-
10	K174I	Инструкция по применению Набора реагентов «Нематоды IgG-ИФА»	1	шт	-
11	K174Q	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Нематоды IgG-ИФА»	1	шт	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2б.

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5.0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированный материал.

5.5. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

5.6. Медицинские отходы класса Б. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 2$ °С;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 5-250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

7.4. Приготовление конъюгата.

Приготовьте конъюгат: для этого разбавьте концентрат конъюгата в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата. ВНИМАНИЕ! Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки!

Пример: на 1 стрип (8 лунок) потребуется 990 мкл конъюгата: 90 мкл концентрата конъюгата + 900 мкл буфера для разведения концентрата конъюгата.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «Нематоды IgG-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 46 исследуемых образцов и 2 контрольных сывороток (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности Набора;

- ИФА-Буфер, концентрат конъюгата, Буфер для разведения концентрата конъюгата, субстратный раствор тетраметилбензидина, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности Набора;

- контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8°C не более 2 месяцев

- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности Набора.

- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток или при температуре +2...+8°C не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

8.5. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается. Допускается исследование сывороток, хранение которых с момента забора крови осуществлялось при температуре от +2 °С до +8 °С не более 7 суток.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов - исследуемые образцы в 2 повторах и 4 лунок для и контрольных сывороток.
2	Разбавьте образцы сыворотки (плазмы) крови в 101 раз, используя ИФА-Буфер (S011Z4). Пример: 5 мкл образца + 500 мкл ИФА-Буфера. Не разбавляйте контрольные сыворотки.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл контрольных сывороток. В остальные лунки внесите в дубликатах по 100 мкл разбавленных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение контрольных сывороток и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
4	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
6	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
7	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
8	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
9	Внесите во все лунки по 100 мкл субстратного раствора тетраметилбензидина. Внесение субстратного раствора тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10-20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
10	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и субстратный раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
11	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.

Продолжение таблицы на стр. 8

12	<p>Рассчитайте содержание IgG антител к нематодам в исследуемых образцах. Для этого:</p> <p>1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля: $\text{ОП (CN174Z)}_{\text{Ср}} = (\text{ОП1 (CN174Z)} + \text{ОП2 (CN174Z)}) / 2;$ Результаты анализа считать достоверными, если - ОП Положительного контроля не ниже 1.0 оптических единиц (ОЕ) - ОП Отрицательного контроля не выше 0.15 ОЕ во всех лунках</p> <p>2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.2 $\text{Cut off} = \text{ОП (CN174Z)}_{\text{Ср}} + 0.2$</p> <p>3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off $\text{ИП} = \text{ОП образца} / \text{Cut off}$</p>
----	---

Таблица М: Подготовка образцов

Вид материала	Сбор, хранение и обработка материала	Пример разведения	Образец в лунку, мкл	Фактор пересчета
сыворотка (плазма) крови	исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных, хилезных и гемолитических образцов может привести к искажению результатов	5 мкл образца + 500 мкл ИФА-Буфера	100	1

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Интерпретация результатов:

При ИП > 1.1 образец положительный.

При ИП < 0.9 - отрицательный.

При значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 - результат в пограничной зоне (+/-).

Такие сыворотки рекомендуется исследовать повторно. Если повторный полученный результат будет неопределенным, то следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2-4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными