

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ IgG АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ЭХИНОКОККА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «Эхинококк IgG-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления IgG антител к антигенам эхинококка в сыворотке (плазме) крови «Эхинококк IgG-ИФА» предназначен для качественного выявления IgG антител к антигенам *Echinococcus granulosus* в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Выявление IgG антител к антигенам ленточных червей *Echinococcus spp.* (*Cestodes*) основано на использовании непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизован антиген *Echinococcus spp.*. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью мышиных моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию специфических IgG антител к антигенам ленточных червей *Echinococcus spp.* (*Cestodes*).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

Использование высокоочищенного препарата позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Воспроизводимость.

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

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	R175Z	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт	-
2	CN175Z CP175Z	Контрольные сыворотки на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgG антител к антигенам ленточных червей <i>Echinococcus</i> spp. (<i>Cestodes</i>), готовы к использованию (2 мл)	2	шт	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
3	T175Z	Конъюгат , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость красного цвета
4	S011Z4	ИФА-Буфер , готов к использованию (100 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
5	R055Z	Субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	Концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26х-кратный (22 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	Стоп-реагент , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	Бумага для заклеивания планшета	2	шт	-
9	K175I	Инструкция по применению Набора реагентов «Эхинококк IgG-ИФА»	1	шт	-
10	K175Q	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Эхинококк 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 «Санитарноэпидемиологические 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 ($+18-25$ °С) 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).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

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

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 15 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 °С в течение всего срока годности Набора;

- ИФА-Буфер, конъюгат, субстратный раствор тетраметилбензидина, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;

- контрольные сыворотки после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;

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

- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.

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

8.4. 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.

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

8.6. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

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 лунки 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 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 раствора субстрата 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 раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стол-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Продолжение таблицы на стр. 7

11	<p>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 выставяйте по воздуху.</p> <p>Рассчитайте содержание IgG антител к антигенам ленточных червей <i>Echinococcus spp.</i> (Cestodes) в исследуемых образцах. Для этого:</p> <p>1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля:</p> $\text{ОП (CN175Z)Cp} = (\text{ОП1 (CN175Z)+ОП2 (CN175Z)}) / 2;$ <p>Результаты анализа считать достоверными, если</p> <ul style="list-style-type: none"> - ОП Положительного контроля не ниже 1.0 оптических единиц (ОЕ) - ОП Отрицательного контроля не выше 0.15 ОЕ во всех лунках <p>2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.2</p> <p>Cut off = ОП (CN175Z)Cp + 0.2</p> <p>3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off</p> <p>ИП = ОПобразца / Cut off</p>
12	

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