

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К СТОЛБНЯЧНОМУ ТОКСИНУ

### EIA-3514, Tetanus toxin IgG ELISA

Каталог. № : EIA-3514  
Количество : 96  
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 11-2013  
Версия 11.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

**Данный анализ предназначен только для диагностического использования *in vitro***

#### 1. ВВЕДЕНИЕ

Настоящий набор иммуноферментного анализа предоставляет материалы для **количественного** определения антител класса IgG в сыворотке к столбнячному токсину.

#### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

**DRG Tetanus Toxin IgG Elisa** - это набор для детекции антител класса IgG к Tetanus Toxin в сыворотке человека. Микротитровальные стрипованные лунки в качестве твердой фазы покрыты инактивированными антигенами к Tetanus toxin. **Разведенные** образцы пациента и **готовые к использованию** контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфичные к Tetanus Toxin антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляется конъюгат антител IgG человека с меткой пероксидазы хрена. Во время второй инкубации этот конъюгат связывается специфически с антителами IgG, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями.

После второй промывки (для удаления несвязанного конъюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции.

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgG специфичных к Tetanus toxin. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA - считывателе.

#### 3. ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Данный набор предназначен только для использования в диагностике *in vitro*.
- Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ 1/2, поверхностному антигену гепатита В и вирусу гепатита С. Однако, во время использования и уничтожения все реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные.
- Контроли и стандарты в культурах клеток оказались неинфекционными.
- Избегайте контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Он может вызывать раздражение кожи и ожоги.
- Никогда не раскапывайте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курите, не принимайте пищу, не пейте и не наносите косметику на территории, где обрабатываются образцы или реагенты набора.
- Надевайте одноразовые перчатки из латекса при обработке образцов и реагентов. Микробиологическое заражение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.
- Обращение должно соответствовать процедурам, указанным в соответствующих государственных руководствах или правилах по биологической безопасности.
- Не используйте реагенты после даты истечения срока годности, которая указана на этикетках набора.
- Согласно протоколу анализа необходимо следовать всем рабочим объемам реагентов.
- Использование калиброванных пипеток и считывающих устройств пластины микротитратора. Оптимальные результаты

анализа можно получить только при использовании откалиброванных дозаторов и микротитровальных планшетных считывателей.

- Не смешивайте и не используйте компоненты наборов с различными номерами партий. Рекомендуется не заменять лунки различных планшетов, даже одной и той же партии. Возможно, что наборы поставлялись и хранились в различных условиях, и связывающие качества планшетов могут в некоторой степени отличаться.
- Исходя из соответствующих государственных руководств или правил по биологической безопасности, химические вещества, и подготовленные или использованные реагенты должны рассматриваться как опасные отходы.
- За информацией относительно опасных веществ, входящих в набор, просьба обращаться к Спецификациям Безопасности Материала. Спецификации Безопасности Материала предоставляются по запросу непосредственно от компании DRG Instruments GmbH. Спецификации Безопасности Материала соответствуют требованиям ЕС-Руководства 91/155 ЕС.

#### 4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

##### 4.1 Содержимое набора

1. **Микротитрационные лунки**, 12x8 (делимые) полоски, 96 лунок; Лунки покрыты антигенами столбнячного токсина (вкл. 1 держатель для полосок и 1 пленку для накрывания).
2. **Раствор для разбавления образцов\***, 1 флакон, 100 мл, готов к использованию, желтого цвета; pH 7.2 ± 0.2.
3. **Стандарт (стандарт 1-3)\***, 3 флакона, S1, S2 и S3 по 2,0 мл каждый. Готовы к использованию; желтого цвета. Белые колпачки. Концентрации: 0,2 – 0,5 – 1,0 МЕД/мл.
4. **Отрицательный контроль\***, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использ., желтого цвета, желтый колпачок.
5. **Положительный контроль\***, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использ., желтого цвета, красный колпачок.
6. **Ферментный конъюгат\***, 1 флакон, 20 мл, готов к использ., красного цвета, антитела к человеческому IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена.
7. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готов к использ., ТМБ.
8. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл готов к использ., содержит 0,2 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
9. **Промывочный раствор\***, 1 флакон, 30 мл (концентрация 20х для 600 мл); pH 6.5 ± 0.1. См. „Подготовка реагентов“.

*Избегайте контакта со стоп раствором. От может вызвать раздражения кожи и ожоги.*

\*содержит безртутный консервант

##### 4.1.1 Необходимые, но не поставляемые материалы

- Микротитрационный планшетный откалиброванный ридер (450/620нм ± 10нм).
- Откалиброванные микропипетки разного объема.
- Инкубатор на 37°C.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Вортексный миксер.
- Деионизированная или (свеже) дистиллированная вода.
- Таймер.
- Промокательная бумага.

##### 4.2 Хранение и стабильность набора

При температуре хранения от 2 до 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты не использовать.

Открытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2-8°C. Как только пакет из фольги был открыт, следует быть внимательным, чтобы его снова плотно закрыть.

Вскрытые наборы сохраняют активность в течение 2 месяцев при соблюдении вышеуказанных условий хранения.

##### 4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием приведите все реагенты и необходимое количество полосок к комнатной температуре.

##### Промывочный раствор

Разбавить Промывочный раствор 1+19 (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистиллированной водой.

Потребление: ~5 мл на определение.

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °C на водяной бане.

Разбавленный промывочный раствор стабилен в течение 4 недель при 2+8°C.

#### 4.4 Уничтожение набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с государственными правилами. Специальная информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности.

#### 4.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Сильно поврежденные отдельные компоненты не должны использоваться в анализе. Они должны храниться до достижения окончательного решения. После этого они должны быть уничтожены согласно официальным правилам.

### 5. ОБРАЗЦЫ

В данном исследовании может использоваться сыворотка.

Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

#### 5.1 Забор образцов

##### Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette для сыворотки), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре. Не центрифугировать пока не произошло полное свертывание. Для пациентов, проходящих антикоагуляционную терапию, может потребоваться больше времени для свертывания.

##### Плазма:

Собрать цельную кровь в центрифужные пробирки с антикоагулянтом и центрифугировать немедленно после забора.

#### 5.2 Хранение и приготовление образцов

Перед анализом образцы должны храниться закрытыми до 3 дней при температуре 2-8°C. Образцы, хранящиеся в течение длительного срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°C. Размороженные образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

#### 5.3 Разбавление образцов

Перед анализом развести каждый образец пациента **1+100** раствором для разведения образцов:

Напр., 10 мкл образца + 1 мл раствора для разведения образцов.

Хорошо перемешать.

*Для пациентов с ожидаемыми концентрациями выше значения концентрации стандарта 3 (1,0 МЕд/мл), необходимо провести второе разбавление 1:10 этого разбавленного 1+100 образца пациента.*

Напр., 20 мкл 1-го разбавления образца + 180 мкл разбавителя образца (хорошо перемешать).

**Внимание:** Стандарты и контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

### 6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

#### 6.1 Общие замечания

- **Очень важно перед началом процедуры анализа все реагенты, образцы и контроли довести до комнатной температуры.**
- Как только начался анализ, все этапы должны быть завершены без прерывания.
- Во избежание перекрестного загрязнения, используйте новые одноразовые пластмассовые наконечники для каждого стандарта, контроля или образца.
- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, снять крышки, установить лунки в рамку и т.д. Это обеспечит равномерное распределение времени для каждого этапа пипетирования без остановки.
- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.
- Чтобы избежать испарения и микробиологического загрязнения, плотно закройте флаконы с реагентами непосредственно после их использования.
- После первого вскрытия и последующего хранения проверьте конъюгат и флаконы контролей на микробиологическое загрязнение для дальнейшего использования.
- Во избежание перекрестного загрязнения и ошибочно высоких результатов, раскапывайте образцы пациентов и распределяйте конъюгат на дно лунок аккуратно без разбрызгивания.
- Во время инкубации накрывайте микротитровальные полоски фольгой, чтобы избежать испарения.

#### 6.2 Процедура анализа

Перед проведением анализа необходимо составить **схему распределения и идентификации** образцов и контролей с помощью формы вложенной в набор.

1. Отобрать требуемое количество микротитровальных полосок или лунок и поместить их в держатель.

Разместите, по крайней мере:

1 лунку	(напр., A1)	для бланка субстрата,
1 лунку	(напр., B1)	для отрицательного контроля,
3 лунки	(напр., от C1)	для стандартов 1-3

На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.

2. Раскапать:

<b>100 мкл</b>	отрицательного контроля	в лунку B1
<b>100 мкл</b>	стандарта 1	в лунку C1
<b>100 мкл</b>	стандарта 2	в лунку D1
<b>100 мкл</b>	стандарта 3	в лунку E1 и
<b>100 мкл</b>	каждого предварительно разбавленного образца	

**новыми одноразовыми наконечниками** в соответствующие лунки. Оставить лунку A1 для бланка субстрата!

3. Накрыть лунки пленкой поставляемой в наборе. Инкубировать: **60 минут при 37 °C.**

4. Резко вытряхните содержимое лунок.

Промойте их **5 раз** разбавленным *промывочным раствором (300 мкл/лунку)*. Резко вытряхните лунки на промокательную бумагу, чтобы удалить остатки жидкости.

##### Примечание:

Чувствительность и точность данного анализа в значительной мере зависит от правильности исполнения процедуры промывки!

5. Раскапать **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки **кроме A1.**

6. Инкубировать: **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °C). Не подвергать воздействию прямого солнечного света!**

7. Резко вытряхнуть содержимое лунок.

Промыть их **5 раз** разбавленным *промывочным раствором (300 мкл/лунку)*. Резко вытряхнуть лунки на промокательную бумагу, чтобы удалить остатки жидкости.

8. Раскапать **100 мкл раствора субстрата во все** лунки.

9. Инкубировать: **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ± 25 °C) в темноте.**

10. Остановить ферментативную реакцию путем внесения **100 мкл стоп-раствора в каждую** лунку. Любое голубое окрашивание, проявившееся во время инкубации, переходит в желтое.

**Примечание:** высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!

11. Считать оптическую плотность при **450/620 нм** с помощью планшетного считывателя в течении **30 минут** после внесения *стоп-раствора*.

#### 6.3 Измерение

**Настроить** микропланшетный считыватель для ELISA **на ноль** используя **бланк субстрата в лунке A1.**

Если по техническим причинам ELISA считыватель не может быть настроен на ноль используя бланк субстрат в лунке A1. Чтобы получить надежные результаты вычитайте значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции.

**Измерить абсорбцию** во всех лунках при 450 нм и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в план.

Рекомендуется использовать для считывания двойную длину волны как референтную на 620 нм. Где применимо, **рассчитать средние значения абсорбции** всех дублей.

### 7. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 7.1 Надежность процесса анализа

Постановка анализа может считаться действительной при соблюдении следующих условий:

- **Бланк субстрата в A1:** ⇒ значение абсорбции **менее 0.100.**
- **Отриц. контроль в B1:** ⇒ значение абсорбции **менее 0.200.**
- **Стандарт 1 (Cut-off) в C1:** ⇒ значение абсорбции **между 0.350-0.850**
- **Стандарт 2 в D1:** ⇒ значение абсорбции **между 0.750-1.450**
- **Стандарт 3 в E1:** ⇒ значение абсорбции **между 0.950-2.000**
- **Положит. контроль в F1:** ⇒ значение абсорбции **между 0.650-3.000**

#### 7.2 Вычисление количественных результатов

Для получения **количественных результатов в МЕ/мл** необходимо вывести (средние) значения абсорбций отрицательного контроля и стандартов 1,2,3 на (миллиметровой) бумаге в системе координат напротив их соответствующих концентраций (0 – 0,2 – 0,5 – 1,0

МЕд/мл) и начертите стандартную калибровочную кривую абсорбции на оси Y, концентрации на оси X.

Считайте результаты из стандартной кривой, используя (средние) значения абсорбции каждого образца пациента и контроля.

Могут быть использованы соответствующие компьютерные программы для считывания и вычисления. Могут быть использованы следующие математические функции: линейная регрессия, вычисления от точки к точке стандартной кривой.

**Примечание:** чтобы получить правильные результаты, значения дополнительно разбавленных (1:10) образцов пациентов должны быть умножены на соответствующий коэффициент разбавления. (Разбавление: 1:10 = коэффициент разбавления: 10). См. п. 5.3 «Разбавление образцов».

### 7.3 Рекомендации по интерпретации результатов

Результат в МЕд/мл	Интерпретация концентрации антител анти-столбнячного токсина (антитоксина) в сыворотке
< 0.1	Надежная защита отсутствует. Рекомендуется усиленная инъекция.
0.1 – 0.5	Надежная защита. Усиленная инъекция приводит к длительной защите).
> 0.5 – 1.1	Надежная защита. Усиленная инъекция через 2-5 лет.
> 1.1 – 5.0	Надежная защита. Усиленная инъекция через 5-10 лет.
> 5.0	Надежная защита. Усиленная инъекция через приблизительно 10 лет.

## 8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно местному законодательству. Использование контрольных образцов рекомендуется для подтверждения достоверности результатов каждый день. Используйте контроли здоровых и патологических уровней.

Также рекомендуется заимствовать информацию из национальных или международных программ подтверждения качества, для того чтобы быть уверенным в точности результатов.

Если результаты анализа вне принятых уровней контрольных материалов, их нужно считать не действительными.

В этом случаи, пожалуйста, проверите следующее: оборудование для раскапывания и установки времени; фотометр; даты истечения срока годности реагентов, условия хранения и инкубации; методы аспирации и промывания.

После проверки выше указанного и в случае если ошибка не была обнаружена, свяжитесь со своим дистрибьютором или производителем.

## 9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

### 9.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяется как вероятность получения негативного результата при отсутствии специфического анализа.

Составляет 100%.

### 9.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется как вероятность получения позитивного результата при присутствии специфического анализа.

Составляет 100%.

## 10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Бактериологическое заражение или повторные циклы замораживания/размораживания образцов может повлиять на значения абсорбции. Только в иммунокомпромиссных пациентов и новорожденных серологические данные имеют ограниченные значения.

## 11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

### 11.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться согласно инструкции производителя. Более того, потребитель должен точно соблюдать все правила профессиональной лабораторной практики или другие соответствующие национальные стандарты и/или законы. Это особенно относится к контрольным реагентам. В процессе проведения анализа важно включать достаточное количество контролей для оценки точности теста. Результаты теста действительны, только если они отвечают нормам и если все параметры теста отвечают спецификации теста. В случае любого сомнения свяжитесь с производителем.

### 11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения не должны базироваться только на результатах лабораторных исследований, даже если они считаются

достоверными согласно п. 11.1. Любой результат является только частью общей клинической картины пациента.

Диагностика инфекционного заболевания не может устанавливаться только на основе единственного результата анализа. Точная диагностика должна учитывать всю клиническую картину пациента (историю, симптомы, сывороточные данные). Только в случаях, когда лабораторные результаты совпадают с нормами и общей картиной пациента, можно делать терапевтическое заключение.

Только результаты этого теста не могут быть основой для терапевтического заключения.

### 11.3 Ответственность

Любое изменение набора и/или замена или компонентов разных лотов с одного набора или с другого может негативно влиять на результаты и весь тест. Такая замена не может быть основой для претензий или просьбы о замене набора.

Претензии в случаях неправильного использования набора лабораторией, исходя из п. 11.2, тоже не могут являться действительными. Не смотря на это, в случае любой претензии, производитель обязывается не повышать значения набора. Производитель не несет ответственности за любое повреждение набора, случившееся вследствие его неправильной транспортировки.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)