

НАБОР ИФА
ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К ASCARIS
LUMBRICOIDES В СЫВОРОТКЕ ИЛИ
ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

EIA-3817, Ascaris lumbricoides IgG ELISA

Каталог. № : EIA-3817
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 08-2011
Версия 10.0



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

2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор Ascaris lumbricoides IgG ELISA предназначен для качественного определения антител класса IgG к Ascaris lumbricoides в сыворотке или плазме (цитратной) человека.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Качественное иммуноферментное определение антител класса IgG к Ascaris lumbricoides основано на ELISA (метод обнаружения специфических антител или антигенов с помощью иммобилизованного на антигене или антителе фермента) методике. Микротитровальные лунки покрыты антигенами Ascaris lumbricoides для связывания соответствующих антител образца. После промывки лунок для удаления несвязанных антител добавляется HRP конъюгат. Этот конъюгат связывается со специфичными Ascaris антителами. Иммуный комплекс, сформированный связанным конъюгатом, становится видимым при добавлении ТМБ субстрата, который дает синюю окраску. Интенсивность данного продукта прямо пропорциональна количеству специфичных Ascaris lumbricoides антител класса IgG в образце. Для остановки реакции добавляется серная кислота. Цвет меняется на желтый. Абсорбция при 450нм считывается при помощи микротитровального планшетного ридера ELISA.

4. МАТЕРИАЛЫ

4.1 Поставляемые реагенты

- **Лунки, покрытые Ascaris lumbricoides (IgG):** 12 делимых 8-луночных стрипов, покрытых Ascaris lumbricoides антигенами; в вакуумной упаковке, в алюминиевой фольге.
- **IgG-раствор для разведения образцов***:** 1 бутылка, содержащая 100 мл готового к использованию буфера для разведения образцов; рН 7.2 ± 0.2; желтого цвета; белая крышка.
- **Стоп раствор:** 1 бутылка, содержащая 15 мл готовой к использованию серной кислоты, 0.2 моль/л; красная крышка.
- **Промывочный раствор (20x концентрат.)*:** 1 бутылка, содержащая 50 мл 20x концентрированного буфера (рН 7.2 ± 0.2) для промывки лунок; белая крышка.
- **Конъюгат протеина А**:** 1 бутылка, содержащая 20 мл пероксидазного протеина А; синего цвета, готовый к использованию; черная крышка.
- **Раствор субстрата ТМБ:** 1 бутылка, содержащая 15 мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ); готовый к использованию; желтая крышка.
- **Положительный контроль Ascaris lumbricoides IgG***:** 1 бутылка, содержащая 2 мл контрольной сыворотки; желтого цвета; готов к использованию; красная крышка.
- **Cut-off контроль Ascaris lumbricoides IgG***:** 1 бутылка, содержащая 3 мл контрольной сыворотки; желтого цвета; готовый к использованию; зеленая крышка.
- **Отрицательный контроль Ascaris lumbricoides IgG***:** 1 бутылка, содержащая 2 мл контрольной сыворотки; желтого цвета; готовый к использованию; синяя крышка.

* содержит 0.1 % Bronidox L после разбавления

** содержит 0.2 % Bronidox L

*** содержит 0.1 % Kathon

4.2 Поставляемые материалы

- 1 держатель для стрипов
- 1 пленка для накрывания лунок
- 1 инструкция пользователя

- 1 схема распределения и идентификации

4.3 Необходимые материалы и оборудование

- Микропланшетный ридер ИФА, предназначенный для измерения абсорбции при 450/620нм
- Инкубатор 37°C
- Ручное или автоматическое устройство для промывки лунок
- Пипетки объемом 10 и 1000 мкл
- Вихревой трубчатый миксер
- Деионизированная или свежедистиллированная вода
- Одноразовые пробирки
- Таймер

5. СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ

Реагенты стабильны до даты срока годности указанной на этикетке при 2 - 8 °С.

6. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед началом анализа важно довести все реагенты, образцы и контроли до комнатной температуры (20...25°C)!

6.1 Обработанные делимые стрипы

Готовые к использованию делимые стрипы покрыты инактивированным антигеном Ascaris lumbricoides. Хранить при температуре 2 - 8°C. Стрипы содержатся в вакуумной упаковке. *Сразу же после открытия упаковки, оставшиеся стрипы необходимо запечатать в фольгированный пакет с влагопоглотителем и хранить при 2...8 °C; стабильны до истечения срока годности.*

6.2 Конъюгат протеина А

Флакон содержит 20мл раствора с протеином А, пероксидазой хрена, буфером, стабилизаторами, консервантами и инертным синим красителем. Раствор готов к использованию. Хранить при 2...8°C. *После первого вскрытия упаковки хранить до истечения даты срока годности при 2...8°C.*

6.3 Контроли

Флаконы с этикетками положительный, Cut-off и отрицательный контроль содержат готовый к использованию контрольный раствор. В растворе содержится 0.1% Kathon, хранить при 2...8°C. *После первого вскрытия упаковки хранить до истечения даты срока годности при 2...8°C.*

6.4 IgG раствор для разведения образцов

Флакон содержит 100 мл фосфата буфера, стабилизаторы, консерванты и инертный желтый краситель, который используется для разведения образцов пациента. Готовый к использованию раствор не обходимо хранить при 2...8°C. *После первого вскрытия упаковки хранить до истечения даты срока годности при 2...8°C.*

6.5 Промывочный раствор (конц. 20x)

Флакон содержит 50 мл. концентрированного буфера, детергенты и консерванты. Развести промывочный раствор 1+19; например 10 мл. промывочного раствора + 190 мл. свежей очищенной редистиллированной воды. Разведенный буфер стабилен на протяжении 5 дней при комнатной температуре. *Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °C на водяной бане. После первого вскрытия концентрат стабилен до окончания срока годности.*

6.6 Раствор субстрата ТМБ

Флакон содержит 15 мл перекиси тетра-метил-бензидин/водорода. Реагент готов к использованию и должен храниться в темноте при 2...8°C. *Раствор должен быть бесцветным или же иметь светло голубой оттенок. Если же субстрат становится голубого цвета, это может означать, что он заражен, и его необходимо выкинуть. После первого вскрытия упаковки хранить до истечения даты срока годности при 2...8°C.*

6.7 Стоп-раствор

Флакон содержит 15 мл 0.2 моль раствора серной кислоты (R 36/38, S 26). Готовый к использованию раствор необходимо хранить при 2...8°C. *После первого вскрытия упаковки хранить до истечения даты срока годности.*

7. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В данном исследовании рекомендуется использовать образцы сыворотки или плазмы (цитрат) человека. Если процедура выполняется в течение 5 дней после забора, образец необходимо хранить при 2...8°C; в противном случае их необходимо поделить на аликвоты и хранить замороженными при (-20 до -70°C). Если же образцы хранятся замороженными, перед началом анализа необходимо тщательно смешать оттаявшие образцы. *Избегать повторного замораживания. Не рекомендуется инактивация образцов нагреванием.*

7.1 Разведение образцов

Перед началом анализа, все образцы необходимо развести 1+100 с IgG раствором для разведения образцов. Раскапать 10 мкл образца и 1мл IgG раствора для разведения образцов в пробирки для получения 1+100 раствора и тщательно смешать вихревым миксером.

8. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

8.1 Подготовка к постановке анализа

Внимательно прочитать инструкцию перед постановкой. Надежность результата зависит от четкого следования инструкции. Данная инструкция описана для ручной процедуры. При проведении анализа на автоматических ИФА-системах рекомендуется увеличить количество промываний от 3 до 5, а количество раствора для промывания – от 300 мкл до 350 мкл во избежание эффектов промывания. Перед выполнением анализа необходимо составить схему распределения и идентификации всех образцов и контролей. Бланк схемы имеется на вкладке в набор. Отобрать необходимое количество микротитровальных стрипов или лунок и установить их в держатель.

Разместить по меньшей мере:

- 1 лунка (A1) для бланка субстрата
- 1 лунка (B1) для отрицательного контроля
- 2 лунки (C1+D1) для cut-off контроля
- 1 лунка (E1) для положительного контроля.

Рекомендуется исследовать контроли и образцы пациента в дублях.

Выполнять все этапы анализа в заданном порядке без перерывов между этапами.

Чистый одноразовый наконечник необходимо использовать для дозирования каждого контроля и образца.

Установить температуру инкубатора на $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

1. Внести по 100 мкл контролей и разведенных образцов в соответствующие лунки. Оставить лунку A1 для бланка субстрата.

2. Накрыть лунки пленкой, поставляемой в наборе.

3. **Инкубировать 1 час \pm 5 минут при $37 \pm 1^\circ\text{C}$.**

4. По окончании инкубации удалить пленку, удалить аспирацией содержимое лунок и промыть каждую лунку трижды 300 мкл промывочного раствора. Избегать выплескивания из реакционных лунок. Время отмачивания между тремя промывками должно быть >5 секунд. В конце осторожно удалить оставшуюся жидкость, выстучав стрипы на впитывающую бумагу! Затем продолжать анализ!

Примечание: Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.

5. Внести по 100 мкл конъюгата протеина А во все лунки кроме лунки бланка. (A1). Накрыть пленкой.

6. **Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.** Не подвергать воздействию прямого солнечного света!

7. Повторить этап 4.

8. Внести по 100 мкл ТМВ-субстрата во все лунки.

9. **Инкубировать ровно 15 минут при комнатной температуре в темноте.**

10. Внести по 100 мкл стоп-раствора во все лунки в том же порядке и с той же скоростью что и раствор ТМВ.

Голубое окрашивание появившееся после инкубации переходит в желтое.

Примечание: Высокоположительные образцы пациентов могут давать темный осадок хромогена. Этот осадок влияет на считывание оптической плотности. Предварительное разведение образцов физраствором хлорида натрия (1+1) рекомендуется. Затем развести 1+100 раствором для разведения образцов и умножить результат в ДЕ на 2.

11. Измерить абсорбцию образцов при 450/620нм не позднее чем через 30 минут после добавления стоп-раствора.

8.2 Измерение

Настроить микропланшетный ридер на ноль, используя бланк субстрата в лунке A1.

Если - по техническим причинам – ридер не может быть установлен на ноль при использовании бланк - субстрата в лунке A1, вычсть значение абсорбции в лунке A1 из остальных значений абсорбции!

Измерить абсорбцию во всех лунках при длине волны 450 нм и записать значения абсорбции каждого контроля и образца пациента в схему распределения и идентификации.

Считывание на альтернативной длине волны (620 нм) рекомендуется.

Где применимо, считать средние значения абсорбции всех дублей.

9. РЕЗУЛЬТАТЫ

9.1 Критерии действительности постановки

Чтобы считать анализ действительным, необходимо соблюдение следующих критериев:

- **Бланк субстрата в A1:** Значение абсорбции < 0.100 .
- **Отрицательный контроль в B1:** Значение абсорбции < 0.200 и $< \text{cut-off}$.
- **Cut-off контроль в C1 и D1:** Значение абсорбции $0.150 - 1.300$.
- **Положительный контроль в E1:** Значение абсорбции $> \text{cut-off}$.

9.2 Подсчет результатов

Cut-off - это среднее значение абсорбции определений cut-off контроля.

Пример: Значение абсорбции Cut-off контроля $0.39 +$ значение абсорбции Cut-off контроля $0.37 = 0.76 / 2 = 0.38$.

Cut-off = 0.38

9.3 Интерпретация результатов

Образцы считаются **положительными** при значении абсорбции более чем на 10 % превышающем cut-off.

Образцы со значением абсорбции на 10% выше или ниже cut-off не считаются положительными или отрицательными, такой результат это **результат в «серой зоне»**

Рекомендуется повторить тест через 2 - 4 недели не свежих пробах пациентов. Если образец во втором тесте опять показывает результат в серой зоне, такой образец считается **отрицательным**.

Образцы считаются **отрицательными** при значении абсорбции менее чем на 10% ниже cut-off.

9.3.1 Результаты в единицах ДРГ

Значение средней абсорбции образца пациента $\times 10 / \text{Cut-off} =$ [единицы ДРГ = ДЕ]

Пример: $\frac{1.204 \times 10}{0.38} = 32 \text{ ДЕ (единицы ДРГ)}$

Cut-off:	10	ДЕ
Средняя зона:	9-11	ДЕ
Отрицательный:	<9	ДЕ
Положительный:	>11	ДЕ

10. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Точность

Между анализами	к-во	Среднее	КВ (%)
Полож. сыворотка	12	13,6	4,8
Отриц. сыворотка	12	2,7	7,0

В анализе	к-во	Среднее	КВ (%)
Полож. сыворотка	16	1,52	3,1
Отриц. сыворотка	16	0,52	3,8

10.2 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяет способность тест-системы показать отрицательный результат при отсутствии специфичного анализата. Она составляет 95%.

10.3 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется как способность метода показать положительный результат при наличии специфичного анализата. Она составляет $> 95\%$.

10.4 Интерференции

Не наблюдается взаимодействия с гемолитической, липемической и иктерической сывороткой в концентрациях до: 10 мг/мл гемоглобина, 5 мг/мл триглицерида и 0,5 мг/мл билирубина.

Внимание: данные результаты касаются группы исследованных образцов, данные спецификации не гарантированы.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Бактериологическое загрязнение или повторные циклы замораживания-размораживания образцов могут повлиять на значения абсорбции. Диагноз инфекционной болезни не должен основываться на результате единственного анализа. Точный диагноз должен принимать во внимание клиническую историю, симптоматику, а также серологические данные.

В иммунодепрессивных пациентов и новорожденных серологические данные имеют только ограниченное значение.

Не может исключаться перекрестная реакция антигенов с антителами к *Toxocara canis*, *Trichinella*, *Fasciola*, *Filaria* и *Strongiloides*.

12. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- В соответствии со ст. 1 параграфа 2b Европейской директивы 98/79/ЕС использование ин-витро диагностической медицинской продукции производителем имеет целью обеспечить соответствие, рабочие качества и безопасность продукции. Поэтому процедуру анализа и меры предосторожности в пользовательских инструкциях необходимо строго соблюдать. Использование тест-систем с анализаторами и аналогичным оборудованием должно быть обоснованным. Любые изменения в схеме, составе и процедуре анализа, а также использование с другой продукцией, не одобренное производителем не является авторизованным и пользователь несет ответственность за такие изменения. Производитель не несет ответственности за ошибочный результат и другие инциденты, полученные по этим причинам. Производитель не несет ответственности за результат полученный в ходе визуального анализа образцов пациентов..
- Не существует полностью надежных методов определения содержания вируса гепатита В, ВИЧ (HIV/HTLV-III/LAV), или других агентов в реагентах данного набора. Таким образом, все продукты человеческой крови, включая образцы пациентов, необходимо рассматривать как потенциально инфицированные.
- Только для диагностики in vitro.
- Не смешивать и не использовать реагенты из наборов с разными номерами лотов.
- Не использовать реагенты других производителей с реагентами данного набора.
- Не использовать реагенты после даты срока годности, указанной на этикетке флакона.
- Использовать только чистые наконечники пипеток, диспенсеров, и лабораторную посуду.
- Не менять местами крышки флаконов с реагентами во избежание кросс-контаминации.
- Плотно закрывать флаконы немедленно после использования во избежание испарения и контаминации.
- После первого открывания и последующего хранения необходимо проверять конъюгат и контроли на контаминацию.
- Во избежание кросс-контаминации и ложнозавышенных результатов пипетировать образцы пациентов и конъюгат без распыления - аккуратно - на дно лунки!
- Разработано исключительно для профессионального использования квалифицированным персоналом.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: В используемой концентрации Bripidox L не имеет токсического воздействия при контакте с кожей или слизистыми оболочками!

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Серная кислота раздражающе действует на кожу и глаза. Не допускать детей! При попадании в глаза тщательно промыть водой и обратиться к врачу!

12.1 Утилизация

Остатки химикатов и препаратов обычно считаются опасными отходами. Утилизация таких отходов регулируется государственным и региональным законодательством. Свяжитесь с соответствующими местными органами по вопросу утилизации опасных отходов.



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
www.diameb.com