



## НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG АНТИТЕЛ К *Echinococcus granulosus* В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА

Кат. №: **G1006**  
Кол-во тестов: **96**  
Производитель: **Vircell Microbiologists (Испания)**

Методика от **12-2010**

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

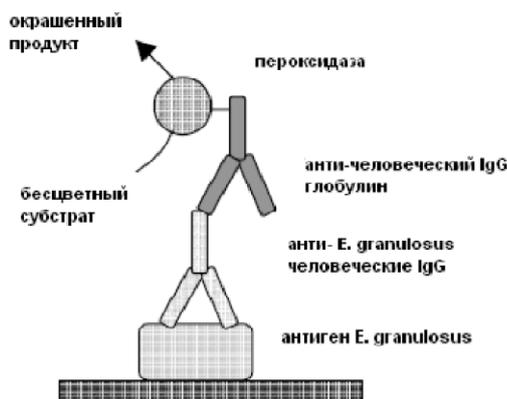
Только для использования в исследовательских целях

### ОПИСАНИЕ

*Echinococcus granulosus* является возбудителем гидатидоза у человека. Гидатидные кисты чаще всего локализуются в печени, преимущественно в правой доле. Интенсивность иммунного ответа зависит от локализации и интеграции кисты. Гидатиды в печени или в костях более реактивны, чем таковые в легких, мозге или в селезенке. Для диагностики чаще всего используют кожную пробу Касони, реакцию связывания комплемента, непрямую геммагглютинация, иммунофлуоресцентный метод и ELISA. Широко распространенный ELISA с использованием антигена из овечьей гидатидной жидкости демонстрирует высокую чувствительность в случае печеночных цист и несколько меньшую при пульмонарной локализации. Перекрестные реакции могут наблюдаться у пациентов, инфицированных другими гельминтами (особенно с цистицеркозом) и при онкологических процессах.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод (ELISA) основан на взаимодействии антител, присутствующих в тестируемом образце, с антигеном, адсорбированном на поверхности полистерола. Не связавшиеся иммуноглобулины удаляются при промывке. Во время второй инкубации антитела к иммуноглобулинам человека, конъюгированные с ферментом, связываются с образовавшимся на предыдущем этапе комплексом антиген-антитело. После второй инкубации и следующей за ней промывкой связавшийся фермент реагирует с субстратом (ТМВ), в результате реакции образуется цветной растворимый продукт (голубого цвета). После добавления кислоты (стоп-раствора) окраска меняется на желтую.



### ПРЕИМУЩЕСТВА МЕТОДА

Все реагенты, за исключением промывающего раствора, поставляются в готовом виде. Раствор для разведения образцов и конъюгат окрашены, для упрощения их распознавания и проведения анализа. Не требуется предварительное разведение образцов. Благодаря «ломаемым» стрипам можно проводить тестирование в единичных лунках и ставить только необходимое количество тестов.

### РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ

1. МИКРОПЛАШЕТ VIRCELL HYDATIDOSIS: 1 шт., 96-луночный микропланшет, покрытый антигеном *Echinococcus granulosus*.
2. VIRCELL буфер для разведения сыворотки: 25 мл раствора для разведения сыворотки, фосфатный буфер, содержащий стабилизаторы, Proclin, и окрашенный в голубой цвет. Готов к использованию.
3. VIRCELL IgG ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ: 500 мкл сыворотки для положительного контроля, содержащей Proclin.
4. VIRCELL IgG КОНТРОЛЬ CUT OFF (КОНТРОЛЬ ДИСКРИМИНАЦИОННОГО УРОВНЯ): 500 мкл сыворотки cut-off контроля, содержащей Proclin.
5. VIRCELL IgG ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ: 500 мкл сыворотки для отрицательного контроля, содержащей Proclin.
6. VIRCELL IgG КОНЪЮГАТ: 15 мл раствора конъюгата антител к IgG человека с пероксидазой в окрашенном в красный цвет буфере, содержит Proclin. Готов к использованию.
7. VIRCELL РАСТВОР СУБСТРАТА ТМВ: 15 мл раствора, содержащего субстрат тетраметилбензидин (ТМВ). Готов к использованию.
8. VIRCELL СТОП-РАСТВОР: 15 мл останавливающего раствора: 0.5 М серная кислота.
9. VIRCELL БУФЕР ДЛЯ ПРОМЫВКИ: 50 мл 20х концентрата буфера для промывки: фосфатный буфер, содержащий Tween<sup>®</sup>-20 и Proclin.

Хранить при **2-8°C**, перед использованием проверить срок годности реагента.

### Необходимые, но не поставляемые материалы:

- Калиброванные дозаторы на 5 и 100 мкл.
- Восьмиканальный дозатор на 100 мкл.
- Промывающее устройство для микропланшетов.
- Термостатируемый инкубатор / водяная баня.
- ИФА анализатор (спектрофотометр для микропланшетов) с возможностью измерения при длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм.
- По возможности – автоматический ИФА анализатор.
- Дистиллированная вода.

### ХРАНЕНИЕ

Хранить при 2-8°C. Не используйте реагенты после истечения срока годности. Срок годности, указанный на упаковке, относится только к невскрытым реагентам, хранящимся при 2-8°C.

### ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ ПОСЛЕ ВСКРЫТИЯ

Реагент	Стабильность и хранение
1х промывочный раствор	4 месяца при 2-8 °C
Остальные реагенты	Срок годности указан на этикетке (2-8 °C)

### СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ И РАБОТА С НИМИ

Работайте в асептических условиях и избегайте микробного загрязнения. Не допускайте высыхания микропланшета между процедурами промывки и добавления реагента. Раствор субстрата чувствителен к свету. Не оставляйте реагент в ярко освещенном месте. Если при хранении реагента появилось голубое окрашивание, это означает, что реагент не пригоден к использованию и должен быть выброшен. Не допускайте контакта раствора субстрата с окислителями, такими как металлы и др. Убедитесь, что субстрат не контактировал с металлическими компонентами. Приготовьте и используйте только то количество буфера для промывки, разведения сыворотки, конъюгата и раствора ТМВ, которое нужно для текущей постановки. Не возвращайте избытки реагентов обратно во флаконы.

VIRCELL, S.L. не несет ответственности за не правильную работу с реагентами, поставляемыми в наборе.

### РЕКОМЕНДАЦИИ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Только для исследовательского использования. Только для профессионального использования.
2. Используйте только компоненты одного набора. Не смешивайте компоненты из разных наборов или производителей. Только буфер для разведения сыворотки, буфер для промывки, стоп-

- раствор и раствор субстрата совместимы с аналогичными реагентами из других наборов VIRCELL ELISA.
- Для каждого шага необходимо использовать чистые сменные наконечники. Используйте только чистые, предпочтительно одноразовые материалы.
  - Не используйте в случае повреждения упаковки.
  - Не пипетируйте ртом
  - Буфер для разведения сыворотки, микропланшет, конъюгат и контроли содержат продукты животного происхождения. Кроме того, контроли содержат компоненты человеческого происхождения. Несмотря на то, что все контрольные человеческие сыворотки, поставляемые с данным набором, были протестированы с отрицательным результатом на присутствие поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антитела к гепатиту С и антитела к ВИЧ, с контрольными сыворотками и образцами крови пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом. Лунки микропланшета покрыты инактивированным антигеном *Echinococcus granulosus*. Однако с ними необходимо обращаться как с инфекционно-опасными. Ни один из известных методов не может дать полной гарантии отсутствия инфекционного агента. Со всеми материалами необходимо работать как с инфекционно-опасными. Соблюдайте правила безопасности, установленные в вашей лаборатории.
  - Раствор субстрата может вызывать раздражение кожи и слизистых оболочек. При контакте с этим реагентом немедленно промойте место попадания раствора большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. Для получения более подробной информации смотрите «Данные по безопасности материала».
  - Рекомендуется проведение предварительного оценочного анализа перед проведением автоматической процедуры анализа.
  - На время инкубации плотно закрывайте планшет адгезивной пленкой.

#### СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Кровь должна быть взята асептически с помощью венопункции квалифицированным персоналом. Использование стерильных или асептических методов сохраняет чистоту образцов. Образцы сыворотки должны храниться охлажденными (2-8 °С) или, в том случае если тестирование не может быть проведено в течение 7 дней, замороженными (-20°C). Не допускайте повторных циклов замораживания-оттаивания. Не используйте гиперлипемические, гемолизные или загрязненные образцы. Образцы, содержащие частицы, должны быть очищены центрифугированием.

#### ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Только буфер для промывок должен быть приготовлен заранее. Разведите 50 мл 20х концентрата буфера для промывок до 1 литра дистиллированной водой. Если в концентрате образовались кристаллы соли, нагрейте концентрат до 37°C перед разведением и дайте кристаллам раствориться. После разведения храните буфер при 2-8 °С.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Установите инкубатор/водяную баню на 37±1°C.
- Перед использованием все реагенты должны достичь комнатной температуры (приблизительно в течение 1 часа), не вынимайте микропланшет из пакета до достижения комнатной температуры.
- Размешайте все реагенты.
- Достаньте микропланшет (1) из упаковки. Определите необходимое количество лунок для анализа, исходя из количества образцов и с учетом 4 дополнительных лунок для контролей: две для сыворотки cut-off контроля и по одной для отрицательной и положительной контрольных сывороток. Остальные лунки, не используемые в текущем анализе, необходимо вернуть обратно в пакет и тщательно закрыть (заклеить).
- Внесите по 100 мкл раствора для разведения сыворотки (2) во все лунки. Внесите по 5 мкл каждого образца, 5 мкл положительного контроля (3), 5 мкл сыворотки cut-off контроля (4), (сыворотка cut-off контроля в дублях) и 5 мкл отрицательного контроля (5) в соответствующие лунки. Если набор ставится вручную, перемешайте планшет на шейкере в течение 2 минут. Если по каким-то причинам перемешать нет возможности, приготовьте разбавления образцов в отдельных пробирках, используя двойной

- объем образца и раствора для разведения, перемешайте и внесите по 105 мкл в соответствующие лунки.
- Закройте лунки клеящейся пленкой и инкубируйте при 37±1°C в течение 45 минут.
- Снимите пленку, удалите жидкость из всех лунок и промойте все лунки 5 раз по 0.3 мл буфера для промывок (9) на лунку. Удалите остатки жидкости после последней промывки.
- Немедленно внесите по 100 мкл соответствующего раствора конъюгата IgG (6А) или (6В) в каждую лунку.
- Закройте лунки клеящейся пленкой и инкубируйте в инкубаторе/водяной бане при 37±1°C в течение 30 минут.
- Снимите пленку, удалите жидкость из всех лунок и промойте все лунки 5 раз по 0.3 мл буфера для промывок (9) на лунку. Удалите остатки жидкости после последней промывки.
- Немедленно внесите по 100 мкл раствора субстрата (7) в каждую лунку.
- Закройте лунки клеящейся пленкой и инкубируйте при комнатной температуре в течение 20 минут. Защищайте от попадания света.
- Снимите пленку и немедленно внесите по 50 мкл стоп-раствора (8) в каждую лунку.
- Считайте оптическую плотность с помощью спектрофотометра при двух длинах волн 450/620 нм в течение 1 часа после остановки реакции.

#### ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждый лот проходит тестирование по критериям внутреннего контроля качества, более строгим, чем критерии оценки качества для пользователей. Предоставляются окончательные результаты контроля качества для каждого лота. Контрольные материалы протестированы с использованием референсных панелей сывороток, прошедших внешний контроль.

#### КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Положительные, отрицательный контроль и контроль cut-off должны включаться в каждую постановку. Они позволяют оценить проведенный анализ.

Оптическая плотность (О.П.) должна попадать в указанные ниже диапазоны. В противном случае результаты должны считаться недействительными и анализ должен быть повторен.

КОНТРОЛЬ	О.П.
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ	>0.9
ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ	<0.5
КОНТРОЛЬ CUT OFF	>0.55
	<1.5

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитайте среднее значение О.П. сыворотки для контроля cut-off.

**Индекс Антител = (О.П. образца / среднее значение О.П. сыворотки для контроля cut-off) x 10.**

Индекс Антител	Интерпретация
< 9	отрицательный
9-11	сомнительный
>11	положительный

Образцы, для которых получен сомнительный результат, должны быть протестированы еще раз и/или должен быть получен новый образец для подтверждения.

Образцы с Индексом Антител менее 9 должны рассматриваться как не содержащие специфических IgG антител к *Echinococcus granulosus*.

Образцы с Индексом Антител более 11 должны рассматриваться как содержащие специфические IgG антитела к *Echinococcus granulosus*.

#### ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

#### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»  
 ООО «БиоТехЛаб-С»  
 ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 тел.: +38 (0342) 775 122  
 факс: +38 (0342) 775 612  
 e-mail: [www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)  
[www.biotechlab-s.com.ua](http://www.biotechlab-s.com.ua)