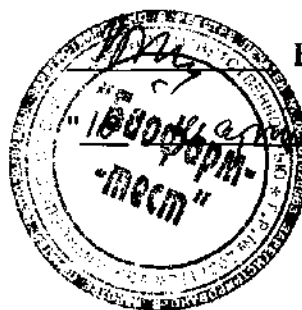


"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ООО «Биофарм-тест»



В.М.Иншакова

2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для полуколичественного определения
регуляторных аутоантител в сыворотке крови женщин детородного возраста
(ЭЛИ-П-ТЕСТ-1)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор ЭЛИ-П-ТЕСТ-1 предназначен для полуколичественного определения содержания регуляторных аутоантител класса IgG, взаимодействующих с ОБМ, белком S100, белковыми фракциями АСВР-С и МР-С, в сыворотке крови женщин детородного возраста методом твердофазного иммуноферментного анализа.

ОБМ (антиген-1) - основной белок миелина, участвующий в регуляции созревания нервных волокон и в регуляции созревания гемопозитических клеток.

S100 (антиген-2) - белок, участвующий в регуляции миграции нейробластов головного и спинного мозга и их функциональной дифференцировке.

АСВР-С (антиген-3) – фракция негистоновых белков хроматина ткани мозга.

МР-С (антиген-4) – фракция мембранных белков ткани мозга.

Естественные аутоантитела к указанным белкам и белковым фракциям являются нормальными компонентами сыворотки крови и синтезируются у всех здоровых лиц в определенном диапазоне значений, мало подверженных индивидуальным колебаниям. Нарушение продукции указанных аутоантител в сыворотке крови женщин детородного

возраста свидетельствует о повышенном риске аномального развития эмбриона и плода.

1.2. Набор ЭЛИ-П-ТЕСТ-1 предназначен для клинического использования в акушерстве, гинекологии и иммунологии в качестве дополнительного метода оценки состояния организма женщин, а именно:

а) для обследования женщин, планирующих беременность, в первую очередь групп риска, для выяснения состояния одного из иммунных звеньев регуляции эмбриогенеза за 1-2 мес до планируемой беременности;

б) для обследования женщин начиная с ранних сроков беременности до 21-23 недель беременности с целью выявления пациентов, относимых к группам повышенного риска аномального развития эмбриона/плода, и проведения необходимых лечебно-профилактических мероприятий;

в) для контроля проводимой терапии.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 70 образцов сыворотки крови в 3 повторях (на каждом из 10 планшетов проводят тестирование 7 образцов анализируемой сыворотки крови и 1 образца контрольной сыворотки).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип работы набора состоит в следующем. В лунках планшета, на поверхности которых сорбированы антигены 1, 2, 3 и 4, после добавления разведенных контрольной и анализируемых проб сыворотки крови и их инкубации устанавливается равновесие между связанными и свободными антителами к соответствующим антигенам. После удаления содержимого лунок и внесения в них раствора конъюгата кроличьих антител к IgG человека с пероксидазой хрена на связанных антителах происходит сорбция молекул конъюгата в количестве, прямо пропорциональном количеству связавшихся антител. После удаления избытка несвязанного конъюгата проводится ферментативная реакция для определения активности пероксидазы, входящей в состав конъюгата. Оценка проводится фотометрически при длине волны 450 нм, после чего рассчитывается относительная иммунореактивность определяемых антител в пробах, выраженная в процентах от иммунореактивности контрольной сыворотки.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- 96-луночные полистироловые планшеты с сорбированными на поверхности лунок антигенами - 10 шт.;

- контрольная сыворотка с известным содержанием антител к антигенам ОБМ, S100, АСВР-С и МР-С - 1 пробирка (0,5 мл);
- конъюгат (поликлональные кроличьи антитела к иммуноглобулинам класса G человека, меченные пероксидазой хрена) - 1 пробирка (1,2 мл);
- концентрат раствора для разведения проб (РРП), 10-кратный - 1 флакон (30 мл);
- концентрат раствора для отмывки планшетов (РОП), 10-кратный - 1 флакон (250 мл);
- концентрат цитратно-фосфатного буферного раствора с перекисью водорода 10-кратный - 1 флакон (12 мл);
- хромоген тетраметилбензидин (ТМБ) - 1 пробирка (1,2 мл);
- стоп-реагент - 1 флакон (30,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность набора. Набор позволяет полуколичественно определять содержание в сыворотке крови аутоантител класса IgG к ОБМ, белку S100, фракциям АСВР-С и МР-С в диапазоне от -90% до +400% от значений контрольной сыворотки.

3.2. Границы физиологического (нормального) уровня антител к антигенам ОБМ, S100, АСВР-С и МР-С находятся в диапазоне от -25% до +30% от значений контрольной сыворотки. Это заключение сделано на основании анализа образцов сыворотки крови в первом триместре беременности у 700 клинически здоровых женщин с физиологическим течением беременности и родивших клинически здоровых детей.

3.3. Значения оптической плотности лунок, содержащих контрольную сыворотку, находятся в диапазоне 0,2-0,5 единиц оптической плотности (ОП).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (серная кислота), в используемых концентрациях не токсичны.

4.3. Серная кислота при попадании на кожу и слизистые вызывает раздражение и ожоги. Поэтому в случае ее попадания на кожные или слизистые покровы следует немедленно тщательно смыть большим количеством проточной воды.

4.4. Меры предосторожности - соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита и другие возбудители вирусных инфекций.

4.6. Использовавшиеся материалы следует утилизировать как потенциально инфицированные. Все жидкие отходы должны быть обеззаражены перед сливом в канализацию, например, обработкой 3% раствором хлорамина или автоклавированием в течение 15 мин при температуре $+120^{\circ}\text{C}$. Флаконы, использовавшиеся для хранения анализируемых образцов, также должны быть обеззаражены.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять величину оптической плотности раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$ и $+56\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- устройство для отмывки планшетов;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменяемыми наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 10; 20; 200; 1000; 1500; 2000 и 3000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 25; 90; 100 и 200 мкл;
- микрошприц вместимостью 25 мкл;
- цилиндры мерные вместимостью 10; 100 и 1000 мл;
- мешалка магнитная;
- колбы стеклянные с пробками вместимостью 10; 100 и 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- пробирки вместимостью 5-10 мл;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Образцы сыворотки крови могут храниться при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 7 дней или при температуре -20°C не более 3 мес. Перед проведением анализа образцы сыворотки крови следует прогреть при температуре $+56^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин.

Все разведения реагентов представлены для проведения анализа на одном планшете (7 образцов анализируемой сыворотки и 1 образец контрольной сыворотки).

6.1. Приготовление рабочего РРП.

При выпадении осадка солей в концентрате РРП необходимо прогреть его при тем-

температуре $+30-40^{\circ}\text{C}$ до полного растворения осадка. В колбу вместимостью 100 мл внести 3,0 мл РРП, добавить 27 мл дистиллированной воды и перемешать.

Полученный рабочий раствор можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 7 дней.

6.2. Подготовка разведений анализируемых сывороток крови.

Образцы сыворотки крови могут храниться при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 7 дней или при температуре -20°C не более 3 мес. Перед проведением анализа образцы сыворотки крови следует прогреть при температуре $+56^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин; к 10 мкл каждой из анализируемых сывороток крови нужно добавить по 2000 мкл рабочего РРП (см. п. 7.1.) и тщательно перемешать. Разведения анализируемых сывороток крови готовить непосредственно перед использованием; хранению не подлежат.

6.3. Подготовка разведения контрольной сыворотки.

Контрольную сыворотку не прогревать! В пробирку вместимостью 5,0 мл внести 10 мкл контрольной сыворотки, добавить 2000 мкл рабочего РРП (см п. 7.1.) и тщательно перемешать. Разведение контрольной сыворотки готовить непосредственно перед использованием; хранению не подлежит.

6.4. Приготовление рабочего РОП.

В колбу вместимостью 1000 мл внести 25 мл концентрата РОП, добавить 225 мл дистиллированной воды и перемешать.

Полученный рабочий раствор можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 7 дней.

6.5. Приготовление рабочего разведения конъюгата.

В колбу вместимостью 10 мл внести 100 мкл конъюгата, добавить 10 мл рабочего РРП (см п. 7.1) и тщательно перемешать. Разведение конъюгата готовить непосредственно перед использованием; хранению не подлежит.

6.6. Приготовление раствора ТМБ.

В колбу вместимостью 10 мл внести 9,0 мл дистиллированной воды, добавить 1,0 мл концентрата цитратно-фосфатного буферного раствора (ЦФР), 100 мкл ТМБ и перемешать.

Полученный раствор можно хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в темном месте не более 20 минут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. В лунки планшета внести по 100 мкл разведенных контрольной и анализируемых сывороток крови (см. п. 7.3 и 7.2, соответственно) в соответствии со схемой, закрыть

планшет крышкой и инкубировать в течение 14-16 ч при температуре +2-8°C.

Схема

Расположение сорбированных антигенов в лунках планшета и схема внесения контрольной и анализируемых сывороток в лунки планшета

Антигены:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A-1 (лунки 1-12)	A	Кс	Кс	Кс	2	2	2	4	4	4	6	6	6
A-2 (лунки 1-12)	B	Кс	Кс	Кс	2	2	2	4	4	4	6	6	6
A-3 (лунки 1-12)	C	Кс	Кс	Кс	2	2	2	4	4	4	6	6	6
A-4 (лунки 1-12)	D	Кс	Кс	Кс	2	2	2	4	4	4	6	6	6
A-4 (лунки 1-12)	E	1	1	1	3	3	3	5	5	5	7	7	7
A-3 (лунки 1-12)	F	1	1	1	3	3	3	5	5	5	7	7	7
A-2 (лунки 1-12)	G	1	1	1	3	3	3	5	5	5	7	7	7
A-1 (лунки 1-12)	H	1	1	1	3	3	3	5	5	5	7	7	7

Обозначения: Слева от схематического изображения планшета указан порядок расположения лунок планшета, содержащих сорбированные антигены по горизонтальным рядам планшета; на схематическом изображении планшета указан порядок внесения контрольной сыворотки (Кс) и семи образцов анализируемых сывороток крови (цифры 1 - 7).

7.2. По окончании инкубации содержимое лунок стряхнуть и 4-кратно отмыть рабочим РОП (см п. 7.4.), внося в лунки по 200 мкл раствора с помощью многоканальной пипетки или вошера, каждый раз удаляя содержимое лунок стряхиванием. Время выполнения процедуры не должно превышать 15 мин.

7.3. Сразу после завершения отмывки во все лунки внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (см п. 7.5); (время выполнения процедуры - не более 5 мин), закрыть планшет крышкой и инкубировать в течение 1,5 ч при температуре +37° С.

7.4. Содержимое лунок стряхнуть и отмыть так, как это указано в п. 8.3.

7.5. Сразу после завершения отмывки во все лунки внести по 90 мкл раствора ТМБ для проявления реакции (см п. 7.6). Время выполнения процедуры - не более 2 мин.

7.6. Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 5-10 мин, после чего остановить реакцию добавлением 25 мкл стоп-реагента в каждую лунку (после появления окраски бледно-синего цвета в лунках с контрольной сывороткой). Время выполнения процедуры - не более 2 мин.

7.7. Измерить оптическую плотность (ОП) растворов в лунках при длине волны 450 нм на фотометре вертикального сканирования в течение 5-10 мин после остановки реакции. В том случае, если невозможно провести измерение ОП в течение указанного времени, планшеты можно хранить в темном месте при +2-8°C не более 30 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Рассчитать средние арифметические значения величин ОП для контрольной сыворотки и для образцов анализируемых сывороток крови. .

8.2. Рассчитать иммунореактивность анализируемых образцов сыворотки крови с каждым из антигенов ОБМ, S100, АСВР-С и МР-С по формулам:

$$\frac{I(a-1) \times 100}{I(k1)} - 100;$$

$$\frac{I(a-2) \times 100}{I(k2)} - 100;$$

$$\frac{I(a-3) \times 100}{I(k3)} - 100;$$

$$\frac{I(a-4) \times 100}{I(k4)} - 100;$$

где: I(a-1) - величина оптической плотности анализируемой сыворотки крови в лунках, содержащих антиген-1;

I(a-2) - величина оптической плотности анализируемой сыворотки крови в лунках, содержащих антиген-2;

I(a-3) - величина оптической плотности анализируемой сыворотки крови в лунках, содержащих антиген-3;

I(a-4) - величина оптической плотности анализируемой сыворотки крови в лунках, содержащих антиген-4;

I(k1) - величина оптической плотности контрольной сыворотки крови в лунках, содержащих антиген-1;

I(k2) - величина оптической плотности контрольной сыворотки крови в лунках, содержащих антиген-2;

I(k3) - величина оптической плотности контрольной сыворотки крови в лунках, содержащих антиген-3;

I(k4) - величина оптической плотности контрольной сыворотки крови в лунках, содержащих антиген-4.

Для расчетов может быть использована соответствующая компьютерная программа.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1. Если относительные значения иммунореактивности анализируемой сыворотки крови с любым из антигенов лежат в диапазоне от -25 до +30 %, предполагается, что сыворотка получена от женщины, относящейся к **группе нормореактивных**.

9.2. Если относительные значения иммунореактивности анализируемой сыворотки крови с любым из антигенов менее -35% и при этом с остальными антигенами не превышают +30%, предполагается, что сыворотка получена от женщины, относящейся к **группе гипореактивных**.

9.3. Если относительные значения иммунореактивности анализируемой сыворотки с любым из антигенов более +40% (но не более +90%) и при этом с остальными антигенами не менее -25%, предполагается, что сыворотка получена от женщины, относящейся к **группе гиперреактивных**.

9.4. Если относительные значения иммунореактивности анализируемой сыворотки с любым из антигенов более +100% и при этом с остальными антигенами не менее +35%, предполагается, что сыворотка получена от женщины, относящейся к **группе с выраженной гиперреактивностью**.

9.5. В том случае, если наблюдается сочетание относительных значений иммунореактивности анализируемой сыворотки с любыми из антигенов выше и ниже эмпирически установленных границ нормы, предполагается, что сыворотка получена от женщины, относящейся к **группе с разнонаправленными изменениями**.

9.6. У женщин, относившихся к группе нормореактивных, условия развития эмбриона и плода являются оптимальными, риск осложнений беременности и рождения детей с пороками развития минимален.

У женщин, относящихся к группе гипореактивных, возможно наличие небольших отклонений в иммунном звене регуляции эмбриона/плода, риск осложнений течения беременности и рождения детей с пороками развития невелик.

У женщин, относящихся к группе гиперреактивных, возможно наличие умеренных изменений в иммунном звене регуляции эмбриона/плода и риск осложнений течения беременности и рождения ребенка с пороками развития повышен.

У женщин, относящихся к группе с выраженной гиперреактивностью, вероятны существенные изменения в иммунном звене регуляции эмбриона/плода; риск осложнений течения беременности и рождения ребенка с пороками развития значительно повышен.

У женщин, относящихся к группе с разнонаправленными изменениями, возможны отклонения в иммунном звене регуляции эмбриона/плода и риск осложнений течения беременности, а также рождения ребенка с пороками развития. Степень этого риска зависит

от степени и характера наблюдаемых отклонений в содержании исследуемых антител.

Если женщина не относится к группе нормы, ей рекомендуется пройти дополнительное обследование (в первую очередь на наличие инфекции и эндокринно-метаболических изменений).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор ЭЛИ-П-ТЕСТ-1 должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре $+25^{\circ}\text{C}$ не более 4 дней и транспортируют при $+2-10^{\circ}\text{C}$.

10.2. Срок годности набора – 6 месяцев.

10.3. Концентраты РРП, РОП, цитратно-фосфатного буферного раствора с перекисью водорода после вскрытия флакона можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 2 мес.

10.4. Рабочие РРП и РОП можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 7 дней.

10.5. Стоп-реагент после вскрытия флакона можно хранить в плотно закрытом виде при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 2 мес.

10.6. Контрольную сыворотку после вскрытия пробирки можно хранить при температуре $+20^{\circ}\text{C}$ не более 3 мес. Разведенная контрольная сыворотка хранению не подлежит.

10.7. Конъюгат кроличьих антител к IgG человека с пероксидазой хрена после вскрытия пробирки можно хранить при температуре -20°C не более 1 мес. Рабочее разведение конъюгата хранению не подлежит.

10.8. Раствор ТМБ после вскрытия флакона можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора.

10.9. Для проведения анализа не следует использовать мутные и сильно гемолизированные сыворотки.

10.10. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов производства других фирм.

Для получения достоверных данных необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора

По вопросам, касающимся качества набора ЭЛИ-П-ТЕСТ-1, следует обращаться в ООО «Биофарм-тест» (111020, г. Москва, Госпитальная площадь, д. 2, стр. 37; тел. (499) 263 16 28; факс (499) 180 80 46.