

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения аденовируса
(RIDASCREEN® Adenovirus)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Adenovirus

Иммуноферментный тест для диагностического обнаружения аденовируса в образцах кала или культуре клеток.

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для диагностического обнаружения аденовируса в образцах кала и для подтверждения присутствия аденовирусов, выращенных в культуре клеток.

2. ВВЕДЕНИЕ

Аденовирусы имеют характерную икосаэдрическую структуру с шипообразными выростами на поверхности. Известно более 50 различных типов вируса, которые могут вызывать инфекции глаз, дыхательных путей и кишечника. Кишечные инфекции вызываются преимущественно типами 40/41. Однако, эти инфекции также могут сопровождаться симптомами, вызванными другими типами энтеритов. Вслед за ротавирусами аденовирусы, а также астровирусы являются второй, наиболее частой причиной вирусной диареи детей. Взрослые люди также могут инфицироваться аденовирусами. Так как в клинических условиях невозможно выявить различия между гастроэнтеритами, вызванными аденовирусами (с одной стороны) и ротавирусами или астровирусами (с другой стороны), пациентов всегда проверяют на наличие всех трех патогенов. В тесте RIDASCREEN® Adenovirus используют моноклональные антитела к гексону, специфическому белку аденовирусов, что позволяет выявлять оба кишечных типа вируса 40/41 и большинство других типов, которые являются причиной инфекции глаз и дыхательных путей.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

В иммуноферментном тесте RIDASCREEN® Adenovirus используют принципы сэндвич-анализа. На поверхность лунок микропланшета сорбируют моноклональные антитела к гексон-антигену. В лунку вносят тестируемую суспензию кала или неразведенный образец культуры клеток, а также другие моноклональные антитела к аденовирусу, конъюгированные с пероксидазой хрена. Если в образце присутствуют аденовирусы, в результате инкубации образуется сэндвич-комплекс, в котором антигены аденовируса находятся между твердой фазой лунок и антителами, конъюгированными с ферментом. Несвязавшийся конъюгат удаляют промывкой. Затем вносят раствор субстрата. Если тест положительный, фермент, связавшийся с лунками, превращает бесцветный субстрат в окрашенный в синий цвет продукт. Добавление стоп-реагента меняет окраску с синего цвета на желтый. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству антигенов аденовируса, присутствующих в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет в рамке-держателе, состоящий из 12 отделяемых 8-луночных стрипов, с адсорбированными мышинными моноклональными антителами к аденовирусам; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
Diluent 1	Буфер для разведения образцов: белковый забуференный раствор NaCl и 0,1% Kathon; окрашен в голубой цвет; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash	Промывочный буфер: 10x концентрат; содержит фосфатный буфер, NaCl, 0,1% тимерозал (мертиолят)	1 x 100 мл
Control +	Положительный контроль: содержит инаktivированные аденовирусы; содержит 0,1% Kathon; готов к использованию	1 x 1,8 мл
Conjugate	Конъюгат фермента: моноклональные антитела к аденовирусу, конъюгированные с пероксидазой хрена, в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,1% Kathon; окрашен в зеленый цвет; готов к использованию	1 x 10 мл
Substrate	Раствор субстрата: содержит пероксид мочевины и тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 10 мл
Stop	Стоп-реагент: 1N серную кислоту	1 x 6 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать только до истечения срока годности, указанного на этикетках флаконов. Разведенный промывочный буфер сохраняется в течение 4 недель при 2-8 °С. Необходимо исключить микробную контаминацию. При несоответствии качества набора гарантийные обязательства не выполняются после истечения срока годности. Пакет из алюминиевой фольги необходимо открывать с помощью ножниц, не повреждая застёжку. Неиспользованные стрипы сразу положите обратно в пакет из фольги, запечатайте пакет и храните его при 2-8 °С. Бесцветный раствор субстрата необходимо хранить в защищенном от света месте, чтобы избежать порчи или появления окраски в результате самоокисления. Если субстрат приобрел синее окрашивание, этот реагент использовать нельзя.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода.

6.2. Оборудование

- Пробирки для анализа
- Трансфер-пипетки (кат. № Z 0001)
- Вортекс (дополнительно, см. раздел 9.3)
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 50-100 мкл и 1 мл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Таймер
- Прибор для промывания микропланшетов или многоканальная пипетка объемом 300 мкл
- Планшетный фотометр (ИФА ридер) (450 нм, дополнительная длина волны сравнения ≥ 600 нм)
- Фильтровальная (или любая другая впитывающая бумага, например, бумажные полотенца)
- Контейнер для утилизации отходов с 0,5% раствором гипохлорита

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Положительный контроль содержит только инаktivированные антигены астровируса. Несмотря на это контроль, как и образцы пациентов, следует считать потенциально инфицированными и обращаться с ними в соответствии с действующими официальными инструкциями.
- Не пипетируйте ртом образцы или реагенты; необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.

- Раствор для разведения образцов и конъюгат фермента содержат 0,1% Катона в качестве консерванта. Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
- Промывочный буфер содержит 0,1% тимеросала в качестве консерванта. Следует избегать его контакта с кожей или слизистыми.
- Пероксид водорода может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент 1N серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121°C, по меньшей мере, в течение одного часа.
- **ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Образцы кала до анализа следует хранить при температуре 2-8 °C. Если нет возможности провести исследование в течение 3 дней, образцы рекомендуется заморозить и хранить при температуре минус 20 °C и ниже. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Не помещайте образцы кала и ректальные мазки в емкости, содержащие транспортные среды с консервантами, сыворотками крови животных, ионами металлов, окислителями или детергентами, поскольку все они могут влиять на результаты анализа RIDASCREEN® Adenovirus.

При использовании ректальных мазков проследите, чтобы образец содержал необходимое для проведения теста количество кала (около 100 мг). При мониторинге следует также отбирать образцы кала у всех, бывших в контакте с пациентом, но не имеющих клинических симптомов, для выявления асимптоматических носителей.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Общие замечания

Перед использованием прогрейте все реагенты и стрипы [Plate] до комнатной температуры (20-25 °C). Не извлекайте стрипы из фольгированной упаковки, пока они не прогреются до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты непосредственно перед использованием. После вскрытия стрипы (в запечатанном пакете) и реагенты необходимо хранить при 2-8 °C. Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы. При внесении реагентов необходимо держать флаконы-капельницы строго вертикально. При внесении образцов суспензии кала и реагентов старайтесь не касаться краев лунок планшета. Для предотвращения перекрестной контаминации необходимо предохранять образцы от контакта с компонентами набора. Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время анализа. Рекомендуем закрывать планшет крышкой или заклеивать пленкой, чтобы не допустить испарения жидкости.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера [Wash] смешайте с 9 частями дистиллированной воды. Если в буфере образовались кристаллы, их необходимо предварительно растворить, поместив флакон на водяную баню при 37 °C.

9.3. Приготовление образцов

Образцы кала разведите с помощью RIDASCREEN® буфера для разведения образцов кала следующим образом: внесите 1 мл RIDASCREEN® буфера для разведения образцов [Diluent 1] в промаркированную пробирку. Наберите около 100 мкл жидкого кала в одноразовую пипетку для образцов (Art. No Z 0001) до второго утолщения и перенесите его в буфер для разведения образцов. Если кал твердый, возьмите эквивалентное количество (размером с горошину, около 50-100 мг) шпателем или одноразовой бактериологической петлей и суспензируйте его в растворе. Хорошо гомогенизируйте образец, набирая и выпуская его пипеткой Pipet или тщательно перемешивая на вортексе.

После кратковременного отстаивания надосадочную жидкость суспензии кала можно непосредственно использовать в анализе. При применении автоматического ИФА анализатора **необходимо** использовать надосадочную жидкость без примеси частиц. Для этого образец следует отцентрифугировать при 5000 об/мин (около 2300 – 2500 g) в течение примерно 5 минут.

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в соответствующие лунки по 2 капли (или 100 мкл) положительного контроля [Control +] или отрицательного контроля (буфера для разведения образцов [Diluent 1]), или разведенных образцов кала. В каждую лунку добавьте по 2 капли (или 100 мкл) конъюгата антител к астровирусу с биотином [Conjugate 1]. Тщательно перемешайте

содержимое лунок, слегка постукивая по краю планшета, и инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) в течение **60 минут**.

9.5. Промывка

Тщательная промывка необходима для получения правильных результатов. Она должна выполняться строго по инструкции. Вылейте или отберите содержимое лунок в контейнер для отходов с дезинфицирующим раствором (гипохлоритом). Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Промойте планшет 5 раз, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку, после чего удалите жидкость из лунок. После каждого цикла промывки удаляйте остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о сухую, не использованную ранее фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для планшетов следует убедиться, что оно подходит для данного типа планшетов. Помимо этого, если в суспензии кала оставались частички, необходимо удалить их из лунок вручную центрифугированием до проведения первого цикла промывки. Это позволит избежать засорения игл промывочного устройства. Следите за тем, чтобы промывочное устройство целиком заполняло ячейки жидкостью и полностью удаляло ее. После последнего цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

9.6. Вторая инкубация

Внесите в каждую лунку по 2 капли (100 мкл) субстрата **Substrate**. Инкубируйте в течение **15 минут** при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте.

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 1 капле (50 мкл) стоп-реагента **Stop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 600 нм) против бланка по воздуху (т.е. без планшета).

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества положительный и отрицательный контроли должны включаться в каждую серию определений, поскольку это позволяет убедиться в стабильности использованных реагентов и правильной постановке анализа. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность (ОП) отрицательного контроля ниже 0,2 и оптическая плотность положительного контроля выше 0,5 при длине волны 450 нм. Если оптическая плотность отрицательного контроля выше 0,2, это может свидетельствовать о недостаточной отмывке.

Если значения контролей не соответствуют предъявляемым требованиям или субстрат помутнел или окрасился в голубой цвет до внесения в лунки, это может свидетельствовать об истечении срока годности реагентов. Пожалуйста, прежде чем повторять анализ, проверьте следующее:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ

11.1. Расчет уровня отсечения (cut-off)

Уровень отсечения (cut-off) рассчитывают, прибавляя 0,15 единиц оптической плотности к измеренной оптической плотности отрицательного контроля.

$$\text{cut-off} = \text{оптическая плотность отрицательного контроля} + 0,15$$

11.2. Интерпретация результатов

Образцы считаются **положительными**, если значение их оптической плотности на 10% выше рассчитанного cut-off.

Образцы, значение оптической плотности которых выше или ниже уровня отсечения в пределах 10% ($\pm 10\%$), нельзя считать четко положительными или четко отрицательными. Результат следует считать **неопределенным** (серая зона). Рекомендуется протестировать эти образцы повторно. Если при повторном анализе свежесобранного образца кала результат снова окажется неопределенным, образец следует считать отрицательным.

Образцы считаются **отрицательными**, если значение оптической плотности на 10% ниже рассчитанного cut-off.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система RIDASCREEN® Adenovirus выявляет антигены *Astrovirus* в образцах кала. Тест не может быть использован для установления зависимости между значениями оптической плотности и выраженностью клинической картины. **Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клиническим диагнозом.** Также существуют бессимптомные вирусоносители (отслеживание контактов), которые могут быть выявлены с помощью ИФА. Всегда крайне важна вирусная нагрузка на момент сбора образца.

Положительный результат на *Astrovirus* не исключает присутствия в образце других патогенных микроорганизмов. Наличие в исследуемом образце двух и более патогенов одновременно также не исключено, но выяснить это можно только проведя дифференциальную диагностику. При смешанной инфекции, вызванной несколькими патогенами, симптомы могут быть более тяжелыми, чем при моновирусной инфекции.

Отрицательный результат в целом не исключает возможности астровирусной инфекции. Это может объясняться несколькими причинами: пульсирующий характер экскреции вируса, количество вирусных частиц в исследуемом образце ниже предела обнаружения набора, образец был собран в неподходящее время, неподходящие для данного образца условия хранения и транспортировки. Если имеется обоснованное подозрение на наличие астровирусной инфекции, следует провести анализ другого образца кала этого пациента.

Неопределенный результат может быть связан с неравномерным распределением вируса в образце кала, вирусной нагрузкой недостаточной для ИФА, при ослаблении инфекции или при неправильной промывке миропланшетов. В этом случае следует выполнить анализ другой суспензии того же образца кала или анализ другого образца кала.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Клинические исследования

В тесте RIDASCREEN® Adenovirus анализировали аденовирус-положительные образцы кала, которые подвергали серийному разведению с помощью буфера для разведения. Счет частиц в неразведенных образцах определяли с помощью электронной микроскопии (ЕМ). Образцы кала содержали $6,14 \times 10^9$ частиц аденовируса в мл. Результаты приведены в табл. 1.

Таблица 2. Разведение образцов, положительных на аденовирус, при исследовании в тесте RIDASCREEN® Adenovirus.

Число частиц	RIDASCREEN® Adenovirus E _{450 nm}
$6,16 \times 10^7$	3,542
$6,16 \times 10^6$	2,701
$3,08 \times 10^6$	1,134
$1,54 \times 10^6$	0,685
$0,77 \times 10^6$	0,502
$*6,16 \times 10^5$	0,490
$6,16 \times 10^4$	0,089

*Предел чувствительности

13.2. Перекрестная реактивность

С помощью теста RIDASCREEN® Adenovirus исследовали множество обычных кишечных патогенов. Результаты исследования были отрицательными. Суспензии бактерий, которые культивировали в течение ночи в среде BHI и которые содержали от 10^6 до 10^8 организмов в 1 мл, анализировали в дубликатах. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Перекрестная реактивность с патогенными микроорганизмами.

Протестированные организмы	Источник	Результат	Суспензия
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	DSM 2403	Отрицательный	0.002
<i>Aeromonas hydrophilia anaerogenes</i>	DSM 30022	Отрицательный	0.002
<i>Aeromonas hydrophilia hydrophilia</i>	DSM 30016	Отрицательный	0.004
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30047	Отрицательный	0.004
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	Отрицательный	0.004
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	Отрицательный	0.008
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	Отрицательный	0.005
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477	Отрицательный	0.010
<i>Escherichia coli</i>	Изолированная	Отрицательный	0.002

Протестированные организмы	Источник	Результат	Суспензия
<i>Escherichia coli</i>	Изолированная	Отрицательный	0.005
<i>Escherichia coli</i>	Изолированная	Отрицательный	0.004
<i>Escherichia hermannii</i>	DSM 4560	Отрицательный	0.003
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 20481	Отрицательный	0.008
<i>Listeria innocua</i>	SLCC 5639	Отрицательный	0.006
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788	Отрицательный	0.003
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479	Отрицательный	0.005
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 30119	Отрицательный	0.000
<i>Providencia stuartii</i>	DSM 6676	Отрицательный	0.001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 939	Отрицательный	0.018
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 4358	Отрицательный	0.007
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50124	Отрицательный	0.003
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291	Отрицательный	0.007
<i>Salmonella agona</i>	Изолированная	Отрицательный	0.003
<i>Salmonella choleraesuis</i>	DSM 4224	Отрицательный	0.005
<i>Salmonella infantis</i>	Изолированная	Отрицательный	0.005
<i>Salmonella ohio</i>	Изолированная	Отрицательный	0.006
<i>Salmonella typhimurium</i>	Изолированная	Отрицательный	0.004
<i>Serratia proteamaculans</i>	DSM 4487	Отрицательный	0.003
<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782	Отрицательный	0.003
<i>Shigella sonnei</i>	DSM 5570	Отрицательный	0.004
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20372	Положительный	0.274
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Изолированная	Отрицательный	0.001
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Изолированная	Отрицательный	0.000
<i>Streptococcus uberis</i>	Изолированная	Отрицательный	0.005
<i>E. coli</i> (O157:H-)	Изолированная	Отрицательный	0.001
<i>E. coli</i> (O116:H21)	Изолированная	Отрицательный	0.000
<i>E. coli</i> (O111:H-)	Изолированная	Отрицательный	0.001
<i>E. coli</i> (O26:H8)	Изолированная	Отрицательный	0.002
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Отрицательный	0,024
<i>Salmonella enteridis</i>	DSM 9898	Отрицательный	0,050
<i>Campylobacter jejuni</i>	DSM 4688	Отрицательный	0,020
<i>Campylobacter coli</i>	DSM 4689	Отрицательный	0,048
<i>Campylobacter fetus</i>	DSM 5361	Отрицательный	0,052
Отрицательный контроль (TSB)			0.004
Положительный контроль набора			2.018
Уровень отсечения			0.150

Повторное исследование наиболее важных организмов после разведения суспензии	Источник	Результат	Суспензия
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Отрицательный	0,002
<i>Salmonella enteridis</i>	DSM 9898	Отрицательный	0,009
<i>Campylobacter jejuni</i>	DSM 4688	Отрицательный	0,0
<i>Campylobacter coli</i>	DSM 4689	Отрицательный	-0,002
<i>Campylobacter fetus</i>	DSM 5361	Отрицательный	0,002
<i>Morganella morganii</i>	DSM 6675	Отрицательный	-0,001
Отрицательный контроль			2,794
Положительный контроль			0,0
Уровень отсечения			0,15

13.3. Воспроизводимость измерения

Воспроизводимость результатов в одном опыте определяли, анализируя аденовирус-положительные и аденовирус-отрицательные образцы, а также положительный контроль (PC) и отрицательный контроль (NC). Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Воспроизводимость внутри опыта.

	PC	Разведенный PC	NC	Положительные образцы	Отрицательные образцы
Количество измерений	32	12	32	12	4
MW (OD)	2,28	0,45	0,03	2,4	0,03
SD	0,133	0,029	0,004	0,245	0,002
CV%	5,83	6,39	12,66	10,22	4,95

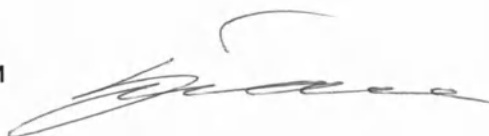
Воспроизводимость между опытами оценивали, анализируя аденовирус-положительные и аденовирус-отрицательные образцы с использованием 4-х (3-х) различных партий набора. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Воспроизводимость данных в различных опытах.

	Разведенный PC	Положительный образец 1	Положительный образец 2	Отрицательный1 образец
Количество измерений	48	48	23	4
Число партий набора	4	4	3	4
MW (OD)	0,56	3,2	2,33	0,03
SD	0,083	0,224	0,232	0,004
CV%	14,78	7,01	9,99	11,28

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

«АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения астровируса
(RIDASCREEN® Astrovirus)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Astrovirus

Иммуноферментный тест для качественного определения Astrovirus в образцах кала человека

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест RIDASCREEN® Astrovirus – диагностическая *in vitro* тест-система для выявления антигена Astrovirus в образцах кала.

2. ВВЕДЕНИЕ

Астровирусы были описаны Appleton и Higgins в 1975 году и названы впоследствии (за свою звездчатую форму) Madeley и Cosgrove, использовавшими электронный микроскоп для идентификации этих маленьких шарообразных вирусов в образцах кала детей, страдающих диареей. Эти вирусы, наравне с калицивирусами и некоторыми другими, относятся к группе так называемых Маленьких шарообразных структурированных вирусов (SRSVs), которые, из-за их явно структурированной поверхности, отличны от группы Маленьких шарообразных вирусов (SRV), имеющих гладкую неструктурированную поверхность. В группу SRV также входят среди прочих парвовирусы и пикорнавирусы.

Эпидемиологическое значение форм гастроэнтеритов, вызванных *Astrovirus*, было совершенно неясно в то время, когда для их идентификации использовали только электронную микроскопию (ЭМ). Поэтому случаи диареи и диареи, сопровождавшейся рвотой, вызванные *Astrovirus*, совершенно недооценивались. Одной из причин этого является относительно низкая чувствительность ЭМ, другой – то, что не всегда можно четко различить частицы SRV. Низкая частота встречаемости 1% не всегда согласуется с данными, полученными серо-диагностическими методами, согласно которым до 70% детей старшего школьного возраста и молодых взрослых людей обладают антителами, специфичными к *Astrovirus*.

Лишь с тех пор, как стали доступными современные методы исследования, такие как иммуноферментный анализ, в 10 – 100 раз более чувствительный, чем ЭМ, и очень чувствительный метод ПЦР, предел определения которого 10^2 частиц на мл образца кала, были оценены важность и вклад *Astrovirus* в развитие диареи, стала возможна дифференциальная диагностика заболеваний, сопровождающихся диареей. В настоящее время частота встречаемости *Astrovirus* в случаях острой диареи составляет 2,5 - 10%, как и у аденовирусов (тип 40/41). И, таким образом, занимает второе место после ротавирусов в качестве этиологического фактора небактериальных гастроэнтеритов.

Среди 7 серотипов, известных к настоящему времени, особую значимость представляют 1 - 5. Гастроэнтериты, вызванные *Astrovirus*, наблюдаются во всех возрастных группах. Однако наиболее часто ими болеют дети и пожилые люди. Особенно часто вспышки этого заболевания отмечаются в детских садах, школах, больницах и домах престарелых. Но гастроэнтериты, вызванные астровирусами, спонтанно появляются и в группах призывников, и в туристических группах. Инфицирование, как и в случае ротавирусов, происходит при употреблении зараженной пищи, особенно устриц, через воду и фекально-оральным способом.

Благодаря использованию высокоспецифичных моноклональных антител иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Astrovirus позволяет надежно идентифицировать антигены *Astrovirus* в разведенных образцах кала.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Astrovirus основан на твердофазном «сэндвич» методе иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием высокоспецифичных антител. На поверхности лунок планшета сорбированы специфичные моноклональные антитела ко всем известным серотипам *Astrovirus*.

В лунки вносят суспензии образцов кала и контроли, затем к ним добавляют моноклональные биотинилированные антитела к астровирусу (Конъюгат 1) и инкубируют при комнатной температуре (20-25°C). После промывки добавляют конъюгат стрептавидина с пероксидазой (Конъюгат 2) и инкубируют при комнатной температуре (20 - 25°C).

В случае присутствия вируса в образце, будет образовываться иммунокомплекс типа «сэндвич» между антителами иммобилизованными на твердой фазой, антигенами астровируса и антителами, конъюгированными с биотин-стрептавидин-пероксидазным комплексом. Избыток несвязавшегося конъюгата стрептавидин-пероксидаза удаляют промывкой. После внесения субстрата в лунках с положительными образцами, благодаря активности пероксидазы, развивается цветная реакция и раствор меняет свою окраску с бесцветного на голубой. После добавления стоп-реагента реакция прекращается, и содержимое лунки изменяет цвет с голубого на желтый. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антигена в исследуемом образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: 96-луночный, в рамке-держателе, разделяемый на двенадцать 8-луночных стрипов, с иммобилизованными моноклональными антителами к астровирусу; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 лунок
Diluent 1	Буфер для разведения образцов: забуференный белковый раствор хлорида натрия; содержит 0,1% Kathon CG (консервант); раствор синего цвета; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash	Промывочный буфер: 10x фосфатный буферный раствор с хлоридом натрия; содержит 0,1% тимерозала (мертиолят); готов к использованию	1 x 100 мл
Control +	Положительный контроль (красная крышка): рекомбинантные антигены <i>Astrovirus</i> ; готов к использованию	1 x 1,8 мл
Conjugate 1	Конъюгат антител к астровирусу с биотином (оранжевая крышка): в стабилизирующем белковом растворе; раствор желтого цвета; готов к использованию	1 x 10 мл
Conjugate 2	Конъюгат стрептавидина с пероксидазой (белая крышка): в стабилизирующем белковом растворе; раствор оранжевого цвета; готов к использованию	1 x 10 мл
Substrate	Субстрат (синяя крышка): пероксид водорода / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 10 мл
Stop	Стоп-реагент (желтая крышка): 0,5 М раствор серной кислоты; готов к использованию	1 x 6 мл
	Инструкция по применению	

5. Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Пробирки для разведения образцов
- Одноразовые пипетки для образцов кала (кат. № Z 0001)
- Вортекс (необязательно, см. п. 9.3)
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 50-100 мкл и 1 мл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка (300 мкл)
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, референтная длина волны ≥ 600 нм)
- Фильтровальная бумага (или любая другая впитывающая бумага, например бумажные полотенца)
- Контейнер для утилизации отходов с 0,5% раствором гипохлорита

6. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Промывочный буфер после разведения следует хранить при 2-8 °С и использовать максимум в течение 4 недель. Следует избегать микробной контаминации. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Фольгированную упаковку со стрипами следует вскрывать с помощью ножниц, не повредив застежку. Неиспользованные стрипы немедленно верните обратно в упаковку, закройте его плотно на застежку и храните строго при температуре 2-8 °С.

Субстрат бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за аутоокисления. Если субстрат приобрел голубую окраску, он становится непригодным для использования.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Положительный контроль содержит только инаktivированные антигены астровируса. Несмотря на это контроль, как и образцы пациентов, следует считать потенциально инфицированными и обращаться с ними в соответствии с действующими официальными инструкциями.
- Не пипетируйте ртом образцы или реагенты; необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите и не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Раствор для разведения образцов и конъюгат фермента содержат 0,1% Катона в качестве консерванта. Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
- Промывочный буфер содержит 0,1% тимеросала в качестве консерванта. Следует избегать его контакта с кожей или слизистыми.
- Пероксид водорода может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °С, по меньшей мере, в течение одного часа.
- **ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Образцы кала до анализа следует хранить при температуре 2-8 °С. Если нет возможности провести исследование в течение 3 дней, образцы рекомендуется заморозить и хранить при температуре минус 20 °С и ниже. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Не помещайте образцы кала и ректальные мазки в емкости, содержащие транспортные среды с консервантами, сыворотками крови животных, ионами металлов, окислителями или детергентами, поскольку все они могут влиять на результаты анализа RIDASCREEN® Astrovirus.

При использовании ректальных мазков проследите, чтобы образец содержал необходимое для проведения теста количество кала (около 100 мг). При мониторинге следует также отбирать образцы кала у всех, бывших в контакте с пациентом, но не имеющих клинических симптомов, для выявления асимптоматических носителей.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Общие замечания

Перед использованием прогрейте все реагенты и стрипы **Plate** до комнатной температуры (20-25 °С). Не извлекайте стрипы из фольгированной упаковки, пока они не прогреются до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты непосредственно перед использованием. После вскрытия стрипы (в запечатанном пакете) и реагенты необходимо хранить при 2-8 °С. Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы. При внесении реагентов необходимо держать флаконы-капельницы строго вертикально. При внесении образцов суспензии кала и реагентов старайтесь не касаться краев лунок планшета. Для предотвращения перекрестной контаминации необходимо предохранять образцы от контакта с компонентами набора. Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время анализа.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера [Wash] смешайте с 9 частями дистиллированной воды. Если в буфере образовались кристаллы, их необходимо предварительно растворить, поместив флакон на водяную баню при 37 °C.

9.3. Подготовка образцов

Образцы кала разведите 1:11 (по объему) с помощью RIDASCREEN® буфера для разведения образцов кала следующим образом: внесите 1 мл RIDASCREEN® буфера для разведения образцов [Diluent 1] в промаркированную пробирку. Наберите около 100 мкл жидкого кала в одноразовую пипетку для образцов (Art. No Z 0001) до второго утолщения и перенесите его в буфер для разведения образцов. Если кал твердый, возьмите эквивалентное количество (размером с горошину, около 50-100 мг) шпателем или одноразовой бактериологической петлей и суспензируйте его в растворе. Хорошо гомогенизируйте образец, набирая и выпуская его пипеткой Pipet или тщательно перемешивая на вортексе.

После кратковременного отстаивания надосадочную жидкость суспензии кала можно непосредственно использовать в анализе. При применении автоматического ИФА анализатора **необходимо** использовать надосадочную жидкость без примеси частиц. Для этого образец следует отцентрифугировать при 5000 об/мин (около 2300 – 2500 g) в течение примерно 5 минут.

Примечание: образцы кала, растворенные в буфере для разведения образцов [Diluent 1], также можно использовать для проведения анализа с помощью других ИФА наборов RIDASCREEN® Rotavirus, Adenovirus, Norovirus и других ИФА наборов RIDASCREEN®, в которых также используется [Diluent 1].

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в соответствующие лунки по 2 капли (или 100 мкл) положительного контроля [Control +] или отрицательного контроля (буфера для разведения образцов [Diluent 1]), или разведенных образцов кала. В каждую лунку добавьте по 2 капли (или 100 мкл) конъюгата антител к астровирусу с биотином [Conjugate 1]. Тщательно перемешайте содержимое лунок, слегка постукивая по краю планшета, и инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) в течение **60 минут**.

9.5. Промывка

Тщательная промывка необходима для получения правильных результатов. Она должна выполняться строго по инструкции. Вылейте или отберите содержимое лунок в контейнер для отходов с дезинфицирующим раствором (гипохлоритом). Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Промойте планшет 5 раз, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку, после чего удалите жидкость из лунок. После каждого цикла промывки удаляйте остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о сухую, не использованную ранее фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для планшетов следует убедиться, что оно подходит для данного типа планшетов. Помимо этого, если в суспензии кала оставались частички, необходимо удалить их из лунок вручную центрифугированием до проведения первого цикла промывки. Это позволит избежать засорения игл промывочного устройства. Следите за тем, чтобы промывочное устройство целиком заполняло ячейки жидкостью и полностью удаляло ее. После последнего цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

9.6. Вторая инкубация

В каждую лунку добавьте по 2 капли (или 100 мкл) конъюгата стрептавидина с пероксидазой [Conjugate 2] и инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) в течение **30 минут**.

9.7. Промывка

Аналогично пункту 9.5.

9.8. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 2 капли (100 мкл) субстрата [Substrate]. Инкубируйте в течение **15 минут** при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте.

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 1 капле (50 мкл) стоп-реагента [Stop]. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 600 нм) против бланка по воздуху (т.е. без планшета).

Примечание: при очень высокой концентрации антигенов астровируса в образце пациента в лунках с субстратом может образовываться темный осадок.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Доведите температуру планшета и реагентов до комнатной (20-25 °C).
2. Приготовьте промывочный буфер.
3. Приготовьте суспензию кала.
4. Поместите в рамку необходимое количество лунок для контролей и образцов.
5. Внесите в лунки по 2 капли или 100 мкл разведенных образцов, положительного контроля и отрицательного контроля.
6. Добавьте по 2 капли или 100 мкл конъюгата антител к астровирусу с биотином и тщательно перемешайте.
7. Инкубируйте в течение 60 минут при комнатной температуре (20-25 °C).
8. Удалите содержимое лунок и промойте 5 раз, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку.
9. Добавьте по 2 капли или 100 мкл конъюгата стрептавидина с пероксидазой и тщательно перемешайте.
10. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре (20-25 °C).
11. Удалите содержимое лунок и промойте 5 раз, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку.
12. Внесите по 2 капли или 100 мкл субстрата.
13. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте.
14. Добавьте 1 каплю или 50 мкл стоп-реагента.
15. Измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра при 450 нм (опционно: референсная длина волны ≥ 600 нм).

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества положительный и отрицательный контроли должны включаться в каждую серию определений, поскольку это позволяет убедиться в стабильности использованных реагентов и правильной постановке анализа. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность (ОП) отрицательного контроля ниже 0,2 и оптическая плотность положительного контроля выше 0,5 при длине волны 450 нм. Если оптическая плотность отрицательного контроля выше 0,2, это может свидетельствовать о недостаточной отмывке.

Если значения контролей не соответствуют предъявляемым требованиям или субстрат помутнел или окрасился в голубой цвет до внесения в лунки, это может свидетельствовать об истечении срока годности реагентов. Пожалуйста, прежде чем повторять анализ, проверьте следующее:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ**11.1. Расчет уровня отсечения (cut-off)**

Уровень отсечения (cut-off) рассчитывают, прибавляя 0,15 единиц оптической плотности к измеренной оптической плотности отрицательного контроля.

$$\text{cut-off} = \text{оптическая плотность отрицательного контроля} + 0,15$$

11.2. Интерпретация результатов

Образцы считаются **положительными**, если значение их оптической плотности на 10% выше рассчитанного cut-off.

Образцы, значение оптической плотности которых выше или ниже уровня отсечения в пределах 10% ($\pm 10\%$), нельзя считать четко положительными или четко отрицательными. Результат следует считать **неопределенным** (серая зона). Рекомендуется протестировать эти образцы повторно. Если при повторном анализе свежесобранного образца кала результат снова окажется неопределенным, образец следует считать отрицательным.

Образцы считаются **отрицательными**, если значение оптической плотности на 10% ниже рассчитанного cut-off.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система RIDASCREEN® Astrovirus выявляет антигены *Astrovirus* в образцах кала. Тест не может быть использован для установления зависимости между значениями оптической плотности и выраженностью клинической картины. **Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клиническим диагнозом.** Также существуют бессимптомные вирусоносители (отслеживание контактов), которые могут быть выявлены с помощью ИФА. Всегда крайне важна вирусная нагрузка на момент сбора образца.

Положительный результат на *Astrovirus* не исключает присутствия в образце других патогенных микроорганизмов. Наличие в исследуемом образце двух и более патогенов одновременно также не исключено, но выяснить это можно только проведя дифференциальную диагностику. При смешанной инфекции, вызванной несколькими патогенами, симптомы могут быть более тяжелыми, чем при моновирусной инфекции.

Отрицательный результат в целом не исключает возможности астровирусной инфекции. Это может объясняться несколькими причинами: пульсирующий характер экскреции вируса, количество вирусных частиц в исследуемом образце ниже предела обнаружения набора, образец был собран в неподходящее время, неподходящие для данного образца условия хранения и транспортировки. Если имеется обоснованное подозрение на наличие астровирусной инфекции, следует провести анализ другого образца кала этого пациента.

Неопределенный результат может быть связан с неравномерным распределением вируса в образце кала, вирусной нагрузкой недостаточной для ИФА, при ослаблении инфекции или при неправильной промывке миропланшетов. В этом случае следует выполнить анализ другой суспензии того же образца кала или анализ другого образца кала.

Использование образцов мекония не было проверено для RIDASCREEN® Astrovirus и поэтому получаемые результаты следует интерпретировать с осторожностью. Исследования с использованием образцов кала отрицательных по астровирусу, в которые были добавлены продукты для ухода за детьми, такие как крема, масла и мази, попадающие в образец кала при его сборе, сегодня не выявили влияния этих добавок на результаты теста. На результаты исследования положительных по астровирусу образцов данные продукты также не оказывали влияния.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Клинические исследования

Сравнительные исследования тест-системы RIDASCREEN® Astrovirus проводили на 120 образцах кала. Эти образцы были проанализированы в Институте Гигиены с применением метода ПЦР в «реальном» времени и затем заморожены при -20 °C. Затем они были разморожены, гомогенизированы и параллельно протестированы набором RIDASCREEN® Astrovirus ИФА и другим коммерческим ИФА набором.

Панель образцов состояла из положительных образцов 51 пациента с гастроэнтеритом (возбудители: 10 – ротавирус, 10 – аденовирус, 10 – норовирус, 21 – астровирус) и 69 отрицательных по вирусному гастроэнтериту образцов пациентов.

Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты сравнительного исследования тест-системами RIDASCREEN® Astrovirus ИФА, коммерческим ИФА набором и RT PCR.

		RIDASCREEN® Astrovirus		Коммерческий ИФА набор	
		положительный	отрицательный	положительный	отрицательный
RT PCR	положительный	16	5	16	5
	отрицательный	0	99	2	97

Чувствительность	76,2%	76,2%
Специфичность	100,0%	98,0%
Положительные прогнозируемые значения	100,0%	88,9%
Отрицательные прогнозируемые значения	95,2%	95,1%
Точность	95,8%	94,2%

13.2. Перекрестная реактивность

Перекрестную реактивность тест-системы RIDASCREEN® Astrovirus исследовали, проводя анализ со многими патогенными микроорганизмами кишечной микрофлоры. Суспензии содержали от 10⁶ до 10⁹ организмов в мл. Перекрестная реактивность не выявлена. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Перекрестная реактивность с патогенными микроорганизмами.

	Микроорганизм	Происхождение	Источник	Неразбавленный образец ОП = 450 нм	Разведение 1:11 ОП = 450 нм
1	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Культура	DSM 2403	0,057	0,082
2	<i>Aeromonas hydrophila anaerogenes</i>	Культура	DSM 30020	0,065	0,063
3	<i>Aeromonas hydrophila hydrophila</i>	Культура	DSM 30016	0,060	0,063
4	<i>Citobacter freundii</i>	Культура	DSM 30047	0,057	0,06
5	<i>Citobacter freundii</i>	Культура	DSM 30039	0,056	0,057
6	<i>Enterobacter cloacae</i>	Культура	DSM 30054	0,053	0,059
7	<i>Enterococcus faecalis</i>	Культура	DSM 2570	0,059	0,061
8	<i>Enterococcus faecium</i>	Культура	DSM 20477	0,057	0,061
9	<i>Escherichia coli</i>	Изолят	LMU Munich	0,061	0,057
10	<i>Escherichia coli</i>	Изолят	LMU Munich	0,055	0,055
11	<i>Escherichia coli</i>	Изолят	LMU Munich	0,053	0,055
12	<i>Escherichia hermannii</i>	Культура	DSM 4560	0,055	0,057
13	<i>Lactococcus lactis</i>	Культура	DSM 20481	0,057	0,056
14	<i>Listeria innocua</i>	Культура	DSM 20649	0,057	0,056
15	<i>Proteus mirabilis</i>	Культура	DSM 788	0,048	0,044
16	<i>Proteus mirabilis</i>	Культура	DSM 4479	0,048	0,045
17	<i>Proteus vulgaris</i>	Культура	DSM 30119	0,049	0,047
18	<i>Providencia stuartii</i>	Культура	LMU Munich	0,056	0,046
19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Культура	DSM 939	0,053	0,046
20	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Культура	DSM 4358	0,054	0,05
21	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Культура	DSM 50124	0,049	0,049
22	<i>Pseudomonas putida</i>	Культура	DSM 291	0,053	0,051
23	<i>Salmonella agona</i>	Изолят	LMU Munich	0,054	0,057
24	<i>Salmonella choleraesuis</i>	Культура	DSM 4224	0,056	0,052
25	<i>Salmonella infantis</i>	Изолят	LMU Munich	0,052	0,051
26	<i>Salmonella Ohio</i>	Изолят	LMU Munich	0,047	0,047
27	<i>Salmonella typhimurium</i>	Изолят	DSM 554	0,055	0,047
28	<i>Serratia proteamaculans (liquefaciens)</i>	Культура	DSM 4487	0,055	0,046
29	<i>Shigella flexneri</i>	Культура	DSM 4782	0,049	0,043
30	<i>Shigella sonnei</i>	Культура	DSM 5570	0,046	0,044
31	<i>Staphylococcus aureus</i>	Культура	DSM 20372	0,062	0,082
32	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Изолят	DSM 2134	0,069	0,062
33	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Изолят	DSM 20662	0,066	0,062
34	<i>Streptococcus uberis</i>	Изолят	DSM 20569	0,06	0,059
35	<i>Escherichia coli</i> (O157:H-)	Изолят	LMU Munich	0,058	0,057
36	<i>Escherichia coli</i> (O116:H21)	Изолят	LMU Munich	0,061	0,057
37	<i>Escherichia coli</i> (O111:H-)	Изолят	LMU Munich	0,063	0,06
38	<i>Escherichia coli</i> (O22:H8)	Изолят	LMU Munich	0,063	0,061
39	<i>Escherichia coli</i> (O26:H11)	Изолят	LMU Munich	0,056	0,057
40	<i>Candida albicans</i>	Культура	ATCC 10231	0,058	0,054
41	<i>Salmonella enteritidis</i>	Культура	DSM 9898	0,057	0,055
42	<i>Campilobacter jejuni</i>	Культура	DSM 4688	0,056	0,056
43	<i>Campilobacter coli</i>	Культура	DSM 4689	0,054	0,055
44	<i>Campilobacter fetus</i>	Культура	DSM 5361	0,055	0,055
45	<i>Helicobacter pylori</i>	Культура	DSM 4867	0,045	0,044
46	<i>Morganella morganii</i>	Культура	DSM 6675	0,045	0,045
47	Adenovirus супернатант клеточной культуры > 10 ⁷	Культура	Micromun	0,047	0,047
48	Adenovirus образец	Кал 1:11	TU DD	-	0,046
49	Rotavirus супернатант клеточной культуры > 10 ⁹	Культура	Microbix	0,046	0,046
50	Rotavirus образец	Кал 1:11	RKI	-	0,049
51	<i>Helicobacter pylori</i> образец	Кал 1:11	Connex	-	0,049
52	<i>C.perfringens</i> 50 мкг/мл	Токсин	R-Bio	0,047	0,051
53	Shigatoxin STX1	Токсин	R-Bio	0,051	0,057

54	<i>Shigatoxin STX2</i>	Токсин	R-Bio	0,049	0,053
55	<i>Cl.sordellii</i>	Культура	TGC	0,05	0,051
56	<i>Cl.difficile</i>	Культура	VPI 1640	0,058	0,047
57	<i>Cryptosporidium parvum >10'</i>	Культура	Waterborn	0,052	0,046
58	<i>Campylobacter</i> образец	Кал 1:11	Enders	-	0,046
59	<i>Giardia Lamblia</i> образец	Кал 1:11	TI Berlin	-	0,043
60	<i>Entamoeba histolytica</i>	Кал 1:11	TI Berlin	-	0,043

13.3. Воспроизводимость

Воспроизводимость внутри опыта оценивали, анализируя 6 образцов кала с различными концентрациями астровируса в 40 повторях, используя набор одной и той же серии. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Воспроизводимость данных внутри опыта.

Образец	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Количество измерений	40	40	40	40	40	40
Среднее значение ОП (450нм)	2,939	2,126	1,725	1,105	0,962	0,318
Стандартное отклонение	0,120	0,170	0,141	0,093	0,060	0,062
Коэффициент вариации, %	4,09%	8,00%	8,17%	8,38%	6,26%	19,49%

Воспроизводимость между опытами оценивали, анализируя 6 образцов кала с различными концентрациями астровируса в течение 20 дней тремя разными людьми, используя разные наборы двух различных серий. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Воспроизводимость данных между опытами.

Образец	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Количество дней	20	20	20	20	20	20
Количество измерений	40	40	40	40	40	40
Воспроизводимость внутри серии						
Среднее значение ОП (450нм)	2,662	1,961	1,541	1,034	0,793	0,285
Стандартное отклонение	0,063	0,127	0,076	0,041	0,032	0,016
Коэффициент вариации, %	2,36%	6,49%	4,91%	4,01%	4,10%	5,54%
Общая воспроизводимость						
Среднее значение ОП (450нм)	2,662	1,961	1,541	1,034	0,793	0,285
Стандартное отклонение	0,232	0,228	0,157	0,117	0,095	0,044
Коэффициент вариации, %	8,71%	11,65%	10,18%	11,28%	12,02%	15,40%

14. Вещества, мешающие определению

Следующие вещества, взятые в определенных концентрациях, при смешении с образцами кала (положительными и отрицательными на антиген астровируса) не оказывали никакого влияния на результаты анализа: сульфат бария (5% масс./масс.), лоперамид (имодиум 5% масс./масс.), Пепто-бисмол (5% об./масс.), муцин (5% масс./масс.), заменитель сахара (5% об./масс.), кровь человека (5% об./масс.), стеариновая кислота/пальмитиновая кислота (смесь 1:1, 40% масс./масс.), метронидазол (0,5) раствор для инъекций (5% об./масс.), диклофенак (0,00263% об./масс.).

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью К.И. Бланк 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения норовируса
(RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation

Иммуноферментный тест 3-го поколения для определения норовирусов геногрупп I и II в образцах кала человека

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation предназначен для выявления *in vitro* норовирусов геногруппы I и геногруппы II в образцах кала человека.

2. ВВЕДЕНИЕ

Название *Norovirus* (NLV, норфолк-подобный вирус), присвоено группе патогенных для человека вирусов, впервые отдифференцированных по морфологическим признакам от классических *Caliciviruses* и описанных как небольшие структурные вирусы округлой формы (SRSV). *Caliciviruses* получили свое название из-за характерных чашевидных выемок (от латинского *calix* - чашечка).

На сегодняшний день норовирус и классические чашечкообразные вирусы объединены в семейство *Caliciviridae*. Все эти SRS-вирусы получили свои названия по местностям, где они были выделены. Так, название *Norwalk-like Virus* дано всем вирусам, изолированным во время вспышек гастроэнтерита, и связано с названием местности, где в 1972 г впервые был выделен этот тип вируса и описан как SRSV-вирус - г. Норфолк штата Огайо. В этом отношении вирус Норфолка является прототипом всех норовирусов. По тому же принципу были названы более поздние изоляты: вирус Снежных гор, гавайский вирус, вирус округа Монтгомери и т. п.

В соответствии с последними директивами Международного комитета по таксонометрии вирусов (ICTV) 2002 г., сейчас различают два рода *Caliciviruses* человека: норовирусы (прежнее название Норфолк-подобный вирус (NLV)) и саповирусы (прежнее название Саппоро-подобный вирус (SLV)). Кроме этого, существуют еще два рода подобных вирусов, патогенных для животных. В настоящее время нет ответа на вопрос, насколько значима передача *Caliciviruses* от животных человеку. Все эти вирусы относятся к икосаэдрическим РНК-содержащим одноцепочечным вирусам, капсид которых состоит в основном из множества копий простого структурного белка, и не культивируются. Они могут вызывать как отдельные инфекции, так и вспышки гастроэнтеритов, при которых могут поражаться все возрастные группы.

Несомненно, что подавляющее большинство случаев всех небактериальных гастроэнтеритов вызывается норовирусами.

Вследствие выраженной генетической вариабельности, род норовирусов разделен на 2 геногруппы (I и II), каждая из которых может быть в свою очередь разделена на 7 (GGI) и 8 (GGII) генотипов, соответственно.

Гастроэнтериты, вызываемые норовирусом, характеризуются тошнотой, сильной рвотой и диареей. Инкубационный период составляет от 6 до 48 часов, после которого симптомы могут длиться 12-60 часов. Так как инфицирующая доза (100 вирусных частиц) чрезвычайно мала, создаются условия для очень эффективной передачи вируса от человека к человеку. Во внешнюю среду вирус выделяется с фекалиями или рвотными массами, поэтому кроме орально-фекального пути передачи имеет значение воздушно-капельный путь передачи возбудителя (через образующие вирусосодержащих аэрозолей). На это указывает часто очень быстрое распространение инфекции в местах скопления большого количества людей. За

некоторым исключением, экскреция вируса длится около 2 недель, что увеличивает дополнительный риск распространения. Реинфекция возможна из-за выраженной изменчивости норовируса, исключающей формирование стойкого иммунитета к нему.

Кроме электронной микроскопии, диагностика (которая обычно проводится при исследовании образца кала) ограничивается в основном обнаружением генного материала вируса методом ПЦР. Так как этот вид анализа достаточно сложный и дорогой, а также требует определенного опыта и лабораторного оборудования, желательно иметь более простой и быстрый скрининговый тест, который можно использовать в течение длительного времени. Набор RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation, в котором используются моноклональные антитела, позволяет проводить высокоспецифическое и чувствительное определение норовирусов обеих геногрупп. В отличие от ротавирусной инфекции, например, вирусная нагрузка кала при острой инфекции, вызванной норовирусом, в 4-6 раз ниже. Поэтому крайне важно собирать образцы кала сразу после возникновения заболевания.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation основан на сэндвич-методе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). В лунках стрипов микропланшета адсорбированы специфические антитела к специфическим антигенам разных генотипов вируса. Образцы кала и контроли вносят в лунки вместе с моноклональными антителами против норовируса, конъюгированными с биотином, и инкубируют при комнатной температуре (20-25 °C). После промывки в лунки вносят конъюгат стрептавидина и пероксидазы и инкубируют при комнатной температуре (20-25 °C). Если в образце присутствует вирус, он связывается на стенках лунок с образованием иммунного комплекса типа "сэндвич" между твердой фазой, антигенами норовируса и антителами, конъюгированными с комплексом биотин-стрептавидин-пероксидаза. Избыток несвязавшегося конъюгата стрептавидин-пероксидаза удаляют промывкой. После внесения субстрата/хромогена наблюдается развитие цветной реакции с переходом бесцветного субстрата/хромогена в синий цвет. После добавления стоп-реагента цвет с синего меняется на желтый. Интенсивность окрашивания раствора в лунках является мерой концентрации антигена в исследуемом образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: 96-луночный, разделяемый на двенадцать 8-луночных стрипов, в рамке-держателе, на дно лунок которых нанесены моноклональные антитела к норовирусу; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 лунок
Diluent 1	Буфер для разведения образцов: белковый раствор хлорида натрия; содержит 0,1% Kathon; синего цвета; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash	Промывочный буфер: 10x концентрат; фосфатный буферный раствор с хлоридом натрия; содержит 0,1% тимерозал (мертиолят)	1 x 100 мл
Control +	Положительный контроль: рекомбинантные антигены норовируса; красного цвета; готов к использованию	1 x 1,8 мл
Conjugate1	Конъюгат антител к норовирусу с биотином: в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,05% проклин 300; синего цвета; готов к использованию	1 x 10 мл
Conjugate2	Конъюгат стрептавидина с пероксидазой: в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,05% проклин 300; красного цвета; готов к использованию	1 x 10 мл
Substrate	Субстрат/хромоген: пероксид водорода/ТМБ; готов к использованию	1 x 10 мл
Stop	Стоп-реагент: 1N раствор серной кислоты; готов к использованию	1 x 6 мл
Инструкция по применению		

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

- Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Микробная контаминация должна быть полностью исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.
- Разведенный промывочный буфер хранят при 2-8 °C, его можно использовать максимум 4 недели.
- Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застёжку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните при температуре 2-8 °C.
- Субстрат/хромоген бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат/хромоген приобрел голубую окраску, он становится непригодным.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Пробирки для разведения образцов
- Трансфер-пипетки для образцов кала (кат. №: Z 0001)
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 50-100 мкл и 1 мл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка (300 мкл)
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, референтная длина волны ≥ 600 нм)
- Фильтровальная бумага (или любая другая впитывающая бумага, например бумажные полотенца)
- Контейнер для утилизации отходов с 0,5% раствором гипохлорита

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

- Только для *in vitro* диагностики.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Положительный контроль содержит инактивированный антиген норовируса. Однако, как положительный контроль, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Не пипетируйте образцы или реагенты; необходимо предотвратить их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – мыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Буфер для разведения образцов, конъюгат и положительный контроль содержат 0,05% проклин 300 в качестве консерванта. Не допускайте его попадания на кожу и слизистые оболочки.
- Промывочный буфер содержит 0,1 % тимеросала в качестве консерванта. Не допускайте его попадания на кожу и слизистые оболочки.
- Пероксид водорода может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 1N серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C не менее одного часа.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы кала следует получать как можно быстрее, в течение 3 дней после появления диареи. До анализа образцы следует хранить при температуре 2-8 °C. Если нет возможности провести исследование в течение 3 дней, образцы рекомендуется заморозить и хранить при температуре минус 20°C и ниже. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Не помещайте образцы кала и ректальные мазки в емкости, содержащие транспортные среды с консервантами, сыворотками крови животных, ионами металлов, окислителями или детергентами, поскольку все они могут влиять на результаты анализа RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation.

При использовании ректальных мазков следите, чтобы образец содержал необходимое для проведения теста количество кала (около 100 мг). При мониторинге следует также отбирать образцы кала у всех, бывших в контакте с пациентом, но не имеющих клинических симптомов, для выявления бессимптомных носителей.

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием прогрейте все реагенты и стрипы **Plate** до комнатной температуры (20-25 °C). Не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока их температура не достигнет комнатной. Тщательно перемешайте реагенты непосредственно перед использованием. После вскрытия стрипы (в запечатанном пакете) и реагенты необходимо хранить при 2-8 °C. Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы. Для предотвращения перекрестной контаминации необходимо предохранять образцы от контакта с компонентами набора. Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время анализа. Для предотвращения испарения реагентов рекомендуется при инкубации закрывать планшет со стрипами крышкой или пленкой.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера **Wash** смешивают с 9 частями дистиллированной воды. Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C.

9.3. Подготовка образцов

Внесите 1 мл буфера для разведения образцов **Diluent 1** в промаркированную пробирку. Наберите около 100 мкл жидкого кала в одноразовую пипетку для образцов кала (Art. No. Z 0001) чуть выше второй отметки и внесите в пробирку, в которую предварительно был внесен буфер для разведения образцов. Если кал твердый, возьмите шпателем или одноразовой петлей эквивалентное количество образца (около 50 -100 мг) и разведите его в растворе. Измельчите образец, набирая и выпуская суспензию кала в буфере пипеткой или тщательно перемешайте его на вортексе. После чего оставьте суспензию на короткий период времени (10 минут), чтобы позволить твердым частицам кала осесть. Для анализа используют надосадочную жидкость.

При применении автоматического ИФА анализатора **необходимо** использовать надосадочную жидкость без примеси частиц. Для этого образец следует отцентрифугировать при 5000 об/мин (около 2300 – 2500 g) в течение 5 минут.

Внимание: Образцы кала, разведенные **Diluent 1**, также можно использовать с наборами RIDASCREEN® Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus, в состав которых входит такой же буфер для разведения образцов.

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 2 капли (или 100 мкл) положительного контроля **Control +** или отрицательного контроля (буфера для разведения образцов **Diluent1**), или разведенного образца кала. Затем внесите по 2 капли (100 мкл) антител, конъюгированных с биотином **Conjugate1**, тщательно перемешайте (слегка постукав по ребру планшета) и инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25 °C) в течение 60 минут.

9.5. Промывка

Промывка является очень важной стадией в процедуре анализа и должна проводиться в строгом соответствии с инструкцией.

Вылейте или аспирируйте содержимое лунок в контейнер для отходов с дезинфицирующим раствором. Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о впитывающую бумагу. Внесите по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку, после чего удалите жидкость из лунок. Повторите цикл промывки 4 раза (всего 5 промывок). Убедитесь, что по окончании промывки в лунках не осталось жидкости.

При использовании автоматического промывочного устройства для планшетов следует убедиться, что оно подходит для данного типа планшетов. Помимо этого, если в суспензии кала оставались частички, необходимо удалить их из лунок вручную центрифугированием до проведения первого цикла промывки. Это позволит избежать засорения игл промывочного устройства. Следите за тем, чтобы промывочное устройство целиком заполняло ячейки жидкостью и полностью удаляло ее. После последнего цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Для достижения оптимальной промывки рекомендуется использовать режим переполнения (по меньшей мере 600 мкл промывочного буфера на лунку). Если число промывок будет превышать 5, это улучшит результат промывки.

9.6. Вторая инкубация

Внесите в каждую лунку по 2 капли (или 100 мкл) конъюгата стрептовицина с пероксидазой **Conjugate 2**. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре (20– 25 °C).

9.7. Промывка

Промойте планшет, как описано в п. 9.5.

9.8. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 2 капли (100 мкл) субстрата/хромогена **Substrate**. Инкубируйте планшет в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте. По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 1 капле (50 мкл) стоп-реагента **Stop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 600 нм) против бланка по воздуху.

Примечание: в сильно положительных образцах пациентов может наблюдаться образование темного осадка субстрата/хромогена.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Прогрейте все реагенты до комнатной температуры (20-25 °C).
2. Внесите в лунки по 2 капли или 100 мкл разведенного образца, или положительного контроля **Control +**, или отрицательного контроля (буфера для разведения образцов **Diluent1**).
3. Внесите по 2 капли или 100 мкл **Conjugate1** и тщательно перемешайте.

4. Инкубируйте в течение **60 минут** при комнатной температуре (20-25 °C).
5. Удалите содержимое лунок и промойте 5 раз, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку (автоматическую промывку проводите в режиме переполнения overflow-mode).
6. Внесите в лунки по **2 капли** или 100 мкл Conjugate2.
7. Инкубируйте в течение **30 минут** при комнатной температуре (20-25 °C).
8. Удалите содержимое лунок и промойте 5 раз, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку (автоматическую промывку проводите в режиме переполнения overflow-mode).
9. Внесите в лунки по **2 капли** или 100 мкл субстрата/хромогена; инкубируйте в течение **15 минут** при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте.
10. Добавьте в каждую лунку **1 каплю** или 50 мкл стоп-реагента, измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества положительный и отрицательный контроли должны включаться в каждую серию определений, поскольку это позволяет убедиться в стабильности используемых реагентов и правильной постановке анализа. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность отрицательного контроля ниже 0,2 и оптическая плотность положительного контроля выше 0,5 при 450 нм. Если оптическая плотность отрицательного контроля выше 0,2, это может свидетельствовать о недостаточной отмывке. Если значения контролей не соответствуют предъявляемым требованиям или субстрат помутнел или окрасился в голубой цвет до внесения в лунки, это может свидетельствовать об истечении срока годности реагентов. Пожалуйста, прежде чем повторять анализ, проверьте следующее:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

11. ОЦЕНКА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

11.1. Расчет уровня отсечения (cut-off)

Уровень отсечения (cut-off) рассчитывают, прибавляя 0,15 единиц оптической плотности к измеренной оптической плотности отрицательного контроля.

$$\text{cut-off} = \text{оптическая плотность отрицательного контроля} + 0,15$$

11.2. Интерпретация результатов

Образцы считаются **положительными**, если их оптическая плотность **выше** порогового уровня отсечения более чем на 10%.

Образцы, значение оптической плотности которых выше или ниже уровня отсечения в пределах 10% ($\pm 10\%$), нельзя считать четко положительными или четко отрицательными. Результат следует считать **неопределенным** (серая зона). Рекомендуется протестировать эти образцы повторно. Если при повторном анализе свежеобработанного образца кала результат снова окажется неопределенным, образец следует считать отрицательным.

Образцы считаются **отрицательными**, если их оптическая плотность **ниже** порогового уровня отсечения более чем на 10%.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Набор реагентов RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation выявляет в образцах кала антигены двух патогенных для человека генотипов (1 и 2) норовируса. Хотя не все генотипы с ассоциированными субтипами исследованы, почти все известные на сегодня генотипы, выявленные при вспышках гастроэнтерита, определяются, когда вирусная нагрузка на момент сбора образца не ниже определяемого в ИФА уровня. Тест нельзя использовать для установления связи между значениями оптической плотности и выраженностью клинических симптомов.

Результаты анализа всегда необходимо интерпретировать с учетом полной клинической картины. Также существуют бессимптомные вирусоносители (отслеживание контактов), которые могут быть выявлены с помощью ИФА. Всегда крайне важна вирусная нагрузка на момент забора образца.

Положительный результат не исключает присутствия в образце других патогенных микроорганизмов. Двойная или множественная инфекция или потенциальные возбудители гастроэнтерита хорошо описаны и могут быть выявлены путем дифференциальной диагностики. Клинические симптомы гораздо более выражены в этих случаях, чем при моноинфекциях.

Отрицательный результат в целом не исключает инфицирования норовирусами. Он может быть получен из-за перемежающейся экскреции вируса, при сборе образца в неподходящее время (см. пункт 8 «Сбор и хранение образцов»), при малой вирусной нагрузке или при неправильной работе с образцами. Если имеется обоснованное подозрение на наличие данной инфекции, следует провести анализ другого образца кала этого пациента.

Сомнительный результат может быть получен при не гомогенном распределении вируса в образце кала, вирусной нагрузкой недостаточной для ИФА, при ослаблении инфекции или при неправильной промывке миропланшетов. В этих случаях необходимо исследовать второе разведение кала того же образца или получить второй образец.

Использование образцов мекония не было проверено для RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation и поэтому получаемые результаты следует интерпретировать с осторожностью. Исследования с использованием образцов кала отрицательных по норовирусу, в которые были добавлены продукты для ухода за детьми, такие как крема, масла и мази, попадающие в образец кала при его сборе, сегодня не выявили влияния этих добавок на результаты теста. На результаты исследования положительных по норовирусам образцов данные продукты также не оказывали влияния.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Исследование качества

В контрольном испытании теста RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation 60 образцов, собранных во время обычного диагностического исследования, были исследованы в зимний период 2004/2005 в Институте вирусологии Дрезденского университета методом ПЦР в реальном времени, а затем были заморожены (- 20 0C) для дальнейшего использования. Были исследованы дополнительные 123 образца, полученные в зимний период 2006 (с января по май), которые также были заморожены для дальнейшего использования после исследования методом ПЦР в реальном времени. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2. Сравнение результатов ИФА теста RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation и референтного ПЦР метода.

		RIDASCREEN Панель WS 2004/5		RIDASCREEN Панель WS 2006/5	
		+	-	+	-
ПЦР в реальном времени	+	28	2	55	15
	-	0	30	0	53

Чувствительность	93,3 %	78,6 %
Специфичность	100,0 %	100,0 %
Предсказанное положительное значение	100,0 %	100,0 %
Предсказанное отрицательное значение	93,8 %	77,9 %
Точность	96,7 %	87,8 %

13.2. Перекрестная реактивность

С помощью набора RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation были протестированы различные патогенные организмы кишечного тракта. Перекрестная реактивность не обнаружена. В исследовании использовали бактериальную суспензию с концентрацией $10^5 - 10^8$ микроорганизмов в мл. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Перекрестная реактивность с патогенными микроорганизмами.

Протестированные микроорганизмы	Происхождение	ОП = 450 нм
<i>Acitenobacter lwoffii</i>	Культура	0,044
<i>Aeromonas hydrophila anaerogenes</i>	Культура	0,043
<i>Citrobacter freundii</i>	Культура	0,043
<i>Citrobacter freundii</i>	Культура	0,042
<i>Aeromonas hydrophila hydrophila</i>	Культура	0,042
<i>Enterobacter cloacae</i>	Культура	0,044
<i>Enterobacter faecalis</i>	Культура	0,041
<i>Enterococcus faecium</i>	Культура	0,079
<i>E. coli</i>	Изолят	0,041
<i>E. coli</i>	Изолят	0,043
<i>E. coli</i>	Изолят	0,043
<i>E. hermanii</i>	Культура	0,042

Протестированные микроорганизмы	Происхождение	ОП = 450 нм
<i>Lactococcus lactis</i>	Культура	0,043
<i>Listeria innocua</i>	Культура	0,042
<i>Proteus mirabilis</i>	Культура	0,042
<i>Proteus mirabilis</i>	Культура	0,041
<i>Proteus vulgaris</i>	Культура	0,042
<i>Providencia stuartii</i>	Культура	0,043
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Культура	0,047
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Культура	0,038
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Культура	0,055
<i>Pseudomonas putida</i>	Культура	0,04
<i>Salmonella agona</i>	Изолят	0,038
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Культура	0,039
<i>Salmonella infantis</i>	Изолят	0,04
<i>Salmonella Ohio</i>	Изолят	0,041
<i>Salmonella typhimurium</i>	Изолят	0,038
<i>Serratia proteamaculans</i>	Культура	0,039
<i>Shigella flexneri</i>	Культура	0,039
<i>Shigella sonnei</i>	Культура	0,075
<i>Staphylococcus aureus</i>	Культура	0,038
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Изолят	0,041
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Изолят	0,038
<i>Streptococcus uberis</i>	Изолят	0,04
<i>E. coli</i> (O157:H-)	Изолят	0,042
<i>E. coli</i> (O116:H21)	Изолят	0,042
<i>E. coli</i> (O111:H-)	Изолят	0,045
<i>E. coli</i> (O26:H8)	Изолят	0,045
<i>E. coli</i> (O26:H11)	Изолят	0,096
<i>Candida albicans</i>	Культура	0,043
<i>Salmonella enteritidis</i>	Культура	0,043
<i>Campylobacter jejuni</i>	Культура	0,044
<i>Campylobacter coli</i>	Культура	0,046
<i>Campylobacter fetus</i>	Культура	0,045
<i>Helicobacter pylori</i>	Культура	0,044
<i>Morganella morganii</i>	Культура	0,043
<i>Astrovirus Zellkulturuberstand</i> > 10 ⁷	Культура	0,089
<i>Astrovirus Probe</i>	Кал 1:10	0,047
<i>Adenovirus Zellkulturuberstand</i> > 10 ⁷	Культура	0,043
<i>Adenovirus Probe</i>	Кал 1:10	0,047
<i>Rotavirus Zellkulturuberstand</i> > 10 ⁹	Культура	0,087
<i>Rotavirus Probe</i>	Кал 1:10	0,048
<i>H.pylori Probe</i>	Кал 1:10	0,054
<i>C.perfringens</i> 50 мкг/мл	Токсин	0,09
<i>Shigatoxin STX1</i>	Токсин	0,045
<i>Shigatoxin STX2</i>	Токсин	0,079
<i>Cl.sordellii</i>	Культура	0,045
<i>Cl.difficile</i>	Культура	0,047
<i>Cryptosporidium parvum</i> >10 ⁷	Культура	0,089
<i>Campylobacter Probe</i>	Кал 1:10	0,064
<i>Giardia Lamblia Probe</i>	Кал 1:10	0,048
<i>Ent. Hystolytica</i>	Кал 1:10	0,08
<i>Salmonella enteritidis Probe</i>	Кал 1:10	0,075

13.3. Воспроизводимость измерения

Воспроизводимость теста RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation внутри опыта оценивали, анализируя одновременно, в 24 повторах, контроли (положительные и отрицательные); высоко- (HPR), средне- (MPR) и низкочувствительные (LPR) образцы кала, содержащие вирусы I геногруппы (GG1); высокочувствительные (HPR), средне- (MPR) и низкочувствительные (LPR) образцы кала, содержащие вирусы II геногруппы (GG2), и отрицательный контроль (NC). Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Воспроизводимость внутри опыта.

Геногруппа I (GG1/1; GG1/3)				
	HPR	MPR	LPR	NC
Среднее значение ОП	2.116	1.134	0.521	0.046
Стандартное отклонение	0.01	0.08	0.07	0.01
Коэффициент вариации, %	3.8	6.7	3.4	10.8
Геногруппа II (GG2/1; GG2/2; GG2/3)				
	HPR	MPR	LPR	NC
Среднее значение ОП	2.128	1.160	0.538	0.045
Стандартное отклонение	0.073	0.076	0.04	0.01
Коэффициент вариации, %	3.4	6.6	6.7	10.9

Воспроизводимость теста RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation в разных опытах оценивали, анализируя одновременно, в 9 повторах, положительные и отрицательные, высоко- (HPR), средне- (MPR) и слабopоложительные (LPR) образцы в течение 3 дней и на 3 различных наборах одной серии, те же самые образцы, которые использовали при изучении воспроизводимости теста внутри опыта. Результаты показаны в таблице 5.

Таблица 5. Воспроизводимость в разных опытах.

	PK	HPR	MPR	LPR	NC
Среднее значение ОП	2,529	2,127	1,111	0,505	0,045
Стандартное отклонение	0,01	0,03	0,02	0,01	0,001
Коэффициент вариации, %	0,4	1,4	1,8	1,0	3,4

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»М.И. Прищепа
ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения ротавируса
(RIDASCREEN® Rotavirus)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Rotavirus

Иммуноферментный тест для диагностического обнаружения ротавируса в образцах кала

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного определения *in vitro* антигена ротавируса в образцах кала методом иммуноферментного анализа.

2. ВВЕДЕНИЕ

Ротавирус – наиболее важная причина небактериальных гастроэнтеритов у детей от 6 месяцев до 3 лет. Заболевания также встречаются у детей старшего возраста и у взрослых. Гастроэнтериты, вызываемые ротавирусом, могут приводить к смертельному исходу в таких группах риска, как младенцы, старики и пациенты с иммунодефицитом. Ротавирусные инфекции наиболее часто встречаются в зимнее время. Описаны случаи эндемий, а также эпидемий, поражающих сразу несколько тысяч людей. 50% образцов, взятых на исследование от детей, госпитализированных с диагнозом острый энтерит, дают положительный результат по ротавирусу. Ротавирусы, передающиеся орально-фекальным путем, выделяются в больших количествах в просвет кишечника и, таким образом, являются опасным источником внутрибольничных заболеваний, в особенности в детских учреждениях и педиатрических клиниках, и с трудом поддаются контролю. Поэтому для обнаружения ротавирусов и для контроля за вспышками заболевания важна ранняя и надежная диагностика. Первым методом, который успешно использовался для обнаружения ротавирусов в кале и биоптатах кишечника пациентов, была электронная микроскопия, которая до сих пор используется в качестве референтного метода исследования. Идентификация ротавирусов *in vitro* после изолирования в культурах клеток – трудоемкий процесс, требующий много времени. Этот метод не используется для рутинного определения ротавирусов. Серологический анализ может только дополнительно свидетельствовать о диагнозе ротавирусного гастроэнтерита, так как антитела класса IgM можно обнаружить самое раннее через 5 дней после появления клинических симптомов. Таким образом, ранняя диагностика с использованием этого метода невозможна. Иммуноферментный тест RIDASCREEN® Rotavirus представляет собой простой и высокочувствительный метод для раннего и надежного обнаружения антигенов ротавируса. С помощью этого определения за короткое время можно протестировать значительное количество образцов.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

В иммуноферментном тесте RIDASCREEN® Rotavirus используют принцип сэндвич-метода. На поверхность лунок микропланшетов сорбируют моноклональные антитела к капсидному белку-продукту шестого вирусного гена (VP6) ротавирусов, который является группоспецифичным антигеном для всех известных патогенных для человека ротавирусов. В лунку вносят аликвоту тестируемой суспензии кала и инкубируют одновременно с другими моноклональными антителами к ротавирусу, конъюгированными с пероксидазой хрена. В результате инкубации образуется сэндвич-комплекс, в котором антигены ротавируса находятся между твердой фазой лунок и антителами, конъюгированными с ферментом. Несвязавшиеся меченые ферментом антитела в дальнейшем удаляют промывкой. В лунки вносят субстрат. Если тест

положительный, фермент, связавшийся с лунками, превращает бесцветный субстрат в окрашенный в синий цвет продукт. Добавление стоп-реагента меняет окраску с синего цвета на желтый. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству антигена ротавируса, присутствующего в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет в рамке-держателе, состоящий из двенадцати отделяемых 8-луночных стрипов, с адсорбированными мышинными моноклональными антителами к ротавирусу; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
Diluent 1	Буфер для разведения образцов: белковый раствор NaCl и 0,1% Kathon; окрашен в голубой цвет; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash	Промывочный буфер: 10x концентрат; фосфатно-солевой буфер, NaCl, 0,1% тимерозал (мертиолят)	1 x 100 мл
Control +	Положительный контроль: инактивированный ротавирус обезьян (SA-11); готов к использованию	1 x 1,8 мл
Conjugate	Конъюгат фермента: моноклональные антитела к ротавирусу, конъюгированные с пероксидазой хрена, в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,1% Kathon; окрашен в зеленый цвет; готов к использованию	1 x 10 мл
Substrate	Субстратный раствор: тетраметилбензидин (ТМБ) / пероксид мочевины; готов к использованию	1 x 10 мл
Stop	Стоп-реагент: содержит 1N серную кислоту	1 x 6 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНИЕНИЮ РЕАГЕНТОВ

- Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Микробная контаминация должна быть полностью исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.
- Разведенный промывочный буфер хранят при 2-8 °С, его можно использовать максимум 4 недели.
- Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застежку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните при температуре 2-8 °С.
- Субстрат/хромоген бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат/хромоген приобрел голубую окраску, он становится непригодным.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода.

6.2. Оборудование

- Дистиллированная или деионизованная вода
- Пробирки для разведения образцов
- Трансфер-пипетки для образцов кала (кат. № Z 0001)
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 50-100 мкл и 1 мл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Таймер
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка (300 мкл)
- Планшетный спектрофотометр (ИФА ридер) (450 нм, при необходимости дополнительная длина волны сравнения ≥ 600 нм)
- Фильтровальная бумага (или любая другая впитывающая бумага, например бумажные полотенца)
- Контейнер для утилизации отходов с 0,5% раствором гипохлорита

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

- Только для *in vitro* диагностики.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Положительный контроль содержит инактивированный антиген норовируса. Однако, как положительный контроль, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Не пипетируйте ртом образцы или реагенты; необходимо предотвратить их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – мыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Буфер для разведения образцов, конъюгат и положительный контроль содержат 0,05% проклин 300 в качестве консерванта. Не допускайте его попадания на кожу и слизистые оболочки.
- Промывочный буфер содержит 0,1 % тимеросала в качестве консерванта. Не допускайте его попадания на кожу и слизистые оболочки.
- Пероксид мочевины может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 1N серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C не менее одного часа.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

До анализа образцы следует хранить при температуре 2-8 °C. Если нет возможности провести исследование в течение 3 дней, образцы рекомендуется заморозить и хранить при температуре минус 20°C и ниже. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Не помещайте образцы кала и ректальные мазки в емкости, содержащие транспортные среды с консервантами, сыворотками крови животных, ионами металлов, окислителями или детергентами, поскольку все они могут влиять на результаты анализа RIDASCREEN® Rotavirus.

При использовании ректальных мазков следите, чтобы образец содержал необходимое для проведения теста количество кала (около 100 мг). При мониторинге следует также отбирать образцы кала у всех, бывших в контакте с пациентом, но не имеющих клинических симптомов, для выявления бессимптомных носителей.

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием прогрейте все реагенты и стрипы [Plate] до комнатной температуры (20-25 °C). Не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока их температура не достигнет комнатной. Тщательно перемешайте реагенты непосредственно перед использованием. После вскрытия стрипы (в запечатанном пакете) и реагенты необходимо хранить при 2-8 °C. Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы. Для предотвращения перекрестной контаминации необходимо предохранять образцы от контакта с компонентами набора. Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время анализа. Для предотвращения испарения реагентов рекомендуется при инкубации закрывать планшет со стрипами крышкой или пленкой.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера [Wash] смешивают с 9 частями дистиллированной воды. Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C.

9.3. Подготовка образцов

Внесите 1 мл буфера для разведения образцов [Diluent 1] в промаркированную пробирку. Наберите около 100 мкл жидкого кала в одноразовую пипетку для образцов кала (Art. No. Z 0001) чуть выше второй отметки и внесите в пробирку, в которую предварительно был внесен буфер для разведения образцов. Если кал твердый, возьмите шпателем или одноразовой петлей эквивалентное количество образца (около 50 -100 мг) и разведите его в растворе. Измельчите образец, набирая и выпуская суспензию кала в буфере пипеткой или тщательно перемешайте его на вортексе. После чего оставьте суспензию на короткий период

времени (10 минут), чтобы позволить твердым частицам кала осесть. Для анализа используют надосадочную жидкость.

При применении автоматического ИФА анализатора **необходимо** использовать надосадочную жидкость без примеси частиц. Для этого образец следует отцентрифугировать при 5000 об/мин (около 2300 – 2500 g) в течение 5 минут.

9.4 Первая инкубация

Поместите в держатель необходимое количество лунок. Внесите в лунки по 2 капли (100 мкл) положительного контроля **Control** **+**, буфера для разведения образцов **Diluent** **1** (отрицательный контроль) или разведенных образцов. Добавьте в каждую лунку по 2 капли (100 мкл) антител, конъюгированных с ферментом **Conjugate**. Тщательно перемешайте и инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) в течение 60 минут.

9.5. Промывка

Для получения точных результатов необходимо тщательно и в полном соответствии с инструкцией проводить процедуру промывки. Вещества, инкубированные в лунках, необходимо удалять из стрипов в контейнер для отходов, содержащий гипохлорит в качестве дезинфицирующего раствора. Чтобы обеспечить полное удаление жидкости из лунок, постучите перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. Затем промойте планшет 5 раз, каждый раз используя по 300 мкл промывочного буфера. Убедитесь в том, что при каждом цикле промывки вы полностью удаляете жидкость из лунок, для этого энергично постучите перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге, которая каждый раз должна быть сухой и ранее неиспользованной.

При применении прибора для автоматической промывки планшетов, убедитесь в том, что прибор отрегулирован под тот тип планшета, который используется в данном тесте. Перед первой промывкой суспензию кала, которая не была освобождена от взвешенных частиц, необходимо вытряхнуть из планшета вручную, чтобы предотвратить засорение игл для промывки. Также во время промывки убедитесь в том, что после каждого цикла жидкость из лунок была откачана полностью. После финальной промывки необходимо энергично постучать перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге или бумажному полотенцу, чтобы удалить все остатки жидкости. Чтобы достигнуть оптимальных результатов промывки, рекомендуется эту процедуру проводить в режиме переполнения, используя на каждой стадии не менее 600 мкл промывочного буфера на лунку. Количество стадий промывки может превышать 5, и обычно это повышает эффективность промывки.

9.6 Вторая инкубация

Добавьте в каждую лунку по 2 капли (100 мкл) субстрата **Substrate**. Инкубируйте планшет 15 мин при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте. После инкубации реакцию останавливают добавлением в каждую лунку по 1 капле (50 мкл) стоп-реагента **Stop**. После аккуратного перемешивания (мягкое постукивание по краю планшета) измеряют оптическую плотность в лунках при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 600 нм) против бланка по воздуху.

Примечание: в сильно положительных образцах пациентов может наблюдаться образование темного осадка субстрата/хромогена.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества положительный и отрицательный контроли должны включаться в каждую серию определений, поскольку это позволяет убедиться в стабильности используемых реагентов и правильной постановке анализа. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность отрицательного контроля ниже 0,2 и оптическая плотность положительного контроля при 450 нм выше 0,8. Если оптическая плотность отрицательного контроля выше 0,2, это может свидетельствовать о недостаточной отмывке. Если значения контролей не соответствуют предъявляемым требованиям или субстрат помутнел или окрасился в голубой цвет до внесения в лунки, это может свидетельствовать об истечении срока годности реагентов. Пожалуйста, прежде чем повторять анализ, проверьте следующее:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

11. ОЦЕНКА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

11.1. Расчет уровня отсечения (cut-off)

Уровень отсечения (cut-off) рассчитывают, прибавляя 0,15 единиц оптической плотности к измеренной оптической плотности отрицательного контроля.

$$\text{cut-off} = \text{оптическая плотность отрицательного контроля} + 0,15$$

11.2. Интерпретация результатов

Образцы считаются **положительными**, если их оптическая плотность **выше** порогового уровня отсечения более чем на 10%.

Образцы, значение оптической плотности которых выше или ниже уровня отсечения в пределах 10% ($\pm 10\%$), нельзя считать четко положительными или четко отрицательными. Результат следует считать **неопределенным** (серая зона). Рекомендуется протестировать эти образцы повторно. Если при повторном анализе свежесобранного образца кала результат снова окажется неопределенным, образец следует считать отрицательным.

Образцы считаются **отрицательными**, если их оптическая плотность **ниже** порогового уровня отсечения более чем на 10%.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Rotavirus выявляет антигены ротавируса в образцах кала. На основании полученных при тестировании значений оптической плотности нельзя прогнозировать появление серьезных клинических симптомов.

Результаты анализа всегда необходимо интерпретировать с учетом полной клинической картины. Положительные результаты не исключают присутствия других инфекционных патогенов.

Отрицательные результаты не исключают инфицирования ротавирусом. Он может быть получен из-за перемежающейся экскреции вируса или из-за невысокого содержания ротавируса в кале. Если пациент страдает анемией или если есть причины подозревать наличие инфекции ротавирусом, необходимо исследовать другой образец кала этого пациента.

Промежуточные результаты могут быть вызваны неравномерным распределением вируса в образце. В этом случае необходимо исследовать другую суспензию кала из того же образца или получить другой образец.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Исследование качества

Тест RIDASCREEN® Rotavirus использовали для исследования 177 образцов кала, взятых у детей, больных гастроэнтеритом. Полученные результаты тестирования сравнивали с результатами, полученными при использовании коммерчески доступного иммуноферментного набора (ИФА), разработанного в Институте П. Эрлиха. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты тестирования с помощью набора RIDASCREEN® Rotavirus и другим апробированным методом.

Метод		ИФА	
		Положительный результат	Отрицательный результат
RIDASCREEN®	Положительный результат	53	0
Rotavirus	Отрицательный результат	2	122

Чувствительность 98,4%

Специфичность 100,0%

Корреляция 98,9%

13.2. Предел чувствительности

В тесте RIDASCREEN® Rotavirus анализировали ротавирус-положительные образцы кала, которые подвергали серийному разведению с помощью буфера для разведения. Количество вирусных частиц в неразведенных образцах определяли с помощью электронной микроскопии (ЕМ). Образцы кала содержали $3,4 \times 10^5$ частиц ротавируса в мл. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Разведение образцов, положительных на ротавирус, при исследовании в тесте RIDASCREEN® Rotavirus.

Количество частиц	RIDASCREEN® E _{450 нм}
3,4 x 10 ⁷	3,118
1,1 x 10 ⁷	2,700
3,8 x 10 ⁶	1,235
1,3 x 10 ⁶	0,416
*4,2 x 10 ⁵	0,164
1,4 x 10 ⁵	0,056

*Предел чувствительности

13.3. Перекрестная реактивность

С помощью теста RIDASCREEN® Rotavirus исследовали множество обычных кишечных патогенов. Результаты исследования были отрицательными. Анализ выполняли на суспензиях бактерий, которые содержали от 10⁵ до 10⁸ организмов в 1 мл. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4. Перекрестная реактивность с патогенными микроорганизмами.

Протестированные микроорганизмы	E _{450 нм}	Протестированные вирусы	E _{450 нм}
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-0,003	Adeno 2	0,051
<i>Aeromonas hydrophilia anaerogenes</i>	-0,007	Adeno 8	0,056
<i>Aeromonas hydrophilia hydrophilia</i>	-0,002	Adeno 14	0,059
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,001	Adeno 15	0,068
<i>Campylobacter coli</i>	-0,003	Coxsackie B 1	0,051
<i>Campylobacter fetus</i>	-0,001	Coxsackie B 2	0,053
<i>Candida albicans</i>	0,001	Coxsackie B 3	0,058
<i>Citrobacter freundii</i>	-0,005	Coxsackie B 4	0,054
<i>Enterobacter cloacae</i>	-0,005	Coxsackie B 5	0,052
<i>Enterococcus faecalis</i>	-0,003	Coxsackie B 6	0,052
<i>Enterococcus faecium</i>	-0,001	Coxsackie A 9	0,052
<i>Escherichia coli</i>	-0,005	Echo 6	0,050
<i>Escherichia hermannii</i>	-0,007	Echo 9	0,047
<i>Lactococcus lactis</i>	-0,006	Echo 11	0,048
<i>Listeria innocua</i>	-0,009	Echo 30	0,054
<i>Proteus mirabilis</i>	-0,001	Polio 1	0,061
<i>Proteus vulgaris</i>	0,004	Polio 2	0,053
<i>Providencia stuartii</i>	-0,001	Polio 3	0,055
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-0,002	Rotavirus negative	0,055
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-0,004	Rotavirus positive	2,378
<i>Pseudomonas putida</i>	-0,004		
<i>Salmonella enteritis</i>	0,003		
<i>Salmonella agona</i>	-0,002		
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-0,002		
<i>Salmonella infantis</i>	-0,001		
<i>Salmonella Ohio</i>	-0,006		
<i>Salmonella typhimurium</i>	-0,007		
<i>Serratia proteamaculans</i>	-0,006		
<i>Shigella flexneri</i>	-0,004		
<i>Shigella sonnei</i>	-0,006		
<i>Staphylococcus aureus</i>	-0,004		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-0,001		
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-0,007		
<i>Streptococcus uberis</i>	-0,010		
<i>E. coli</i> (O157:H-)	-0,008		
<i>E. coli</i> (O116:H21)	-0,006		
<i>E. coli</i> (O111:H-)	-0,004		
<i>E. coli</i> (O26:H8)	-0,004		

13.4. Воспроизводимость измерения

Воспроизводимость результатов в одном опыте определяли, анализируя три различных образца с различными концентрациями SA-11 ротавируса. Определение проводили 24 раза в дубликатах с использованием реактивов одной и той же партии набора. Определяли среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5. Воспроизводимость данных в одном опыте.

	отрицательный	слабо положительный	высокий положительный
В одном опыте			
Среднее поглощение	0,035	0,321	2,567
Стандартное отклонение	0,0019	0,0157	0,0411
Коэффициент вариации (%)	5,46	4,88	1,60

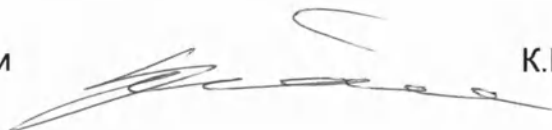
Воспроизводимость результатов в различных опытах определяли, анализируя три образца с различными концентрациями SA-11 ротавируса (n=6), используя пять различных партий набора. Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6. Воспроизводимость данных в различных опытах.

	отрицательный	слабо положительный	высокий положительный
В различных опытах			
Среднее поглощение	0,038	0,367	2,573
Стандартное отклонение	0,0005	0,0333	0,1527
Коэффициент вариации (%)	1,37	9,08	5,93

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**Набор реагентов для определения IgG антител к парвовирусу B19
(RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgG)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)****RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgG**

Иммуноферментный тест для количественного определения IgG антител к парвовирусу B19.

Набор рассчитан на 96 определений**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Иммуноферментный тест RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgG предназначен для количественного определения специфических IgG антител к парвовирусу B19 в сыворотке крови человека.

2. ВВЕДЕНИЕ

Человеческий парвовирус B19 был открыт Cossart и соавт. в Англии в 1975 г. Эти авторы открыли вирус при исследовании сывороток крови доноров на наличие гепатита В. Случайно обнаруженный изолят был назван B19.

Парвовирус B19 – небольшой, безоболочечный ДНК-вирус диаметром 18-26 нм. Геном состоит из одноцепочечной ДНК длиной 5,4 тыс. оснований. Капсид состоит из двух полипептидных белков 84 кДа и 58 кДа (VP1 и VP2). Кроме того, основной неструктурный белок (NS-1) кодируется в геноме; он необходим для репликации и размножения вируса. Вирус B19 имеет икосаэдрическую структуру и обладает высокой термостабильностью. Он может выдерживать нагревание при 60 °C до 12 часов.

В род парвовирусов входят (близкие к единственно известному человеческому парвовирусу B19) патогены животных, такие как парвовирус собаки и кошачий вирус панлейкопении. Вместе с денсовирусами и депендовирусами, которые для репликации нуждаются в вирусах-помощниках (аденовирус или вирус герпеса), парвовирусы образуют семейство Parvoviridae.

Одной из важных характеристик парвовирусов является их способность селективно реплицироваться в делящихся клетках (костного мозга, кишечника, эмбриональных клетках).

Инфицирование широко распространенным парвовирусом B19 человека чаще всего отмечается зимой или ранним летом. Они могут перерасти в эпидемию, в особенности в медицинских учреждениях и школах. Передача происходит в основном через дыхательную систему (воздушно-капельный путь), но также через кровь или продукты из крови. Инфицирование парвовирусом наблюдается во всех возрастных группах, но наиболее часто встречается в возрасте от 6 до 15 лет. Частота заболевания увеличивается с возрастом и достигает 40-70% у взрослых. У женщин заболевание встречается чаще, чем у мужчин.

Инкубационный период длится 1-3 недели. Виремическая фаза ограничивается 3-7 днями. В это время у пациента могут отсутствовать симптомы заболевания или он может жаловаться на некоторые предшествующие болезни симптомы, такие как головная боль, зуд, боль в мышцах и лихорадка.

Приблизительно через две недели после инфицирования может появиться инфекционная эритема (пятая болезнь). У детей обычно появляется типичная экзантема (покраснение щек, сеткообразная фебрильная пурпура, в особенности на разгибательной поверхности конечностей), но эти признаки скорее нетипичны для взрослых. Дальнейшими симптомами инфекции B19 являются боль в суставах и артрит (60%), респираторные симптомы (22%), а также диарея (15-35%). Только в 20% всех случаев инфицирования парвовирусом B19 симптомы заболевания отсутствуют. У женщин боли в суставах встречаются в два раза чаще, чем у мужчин. В большинстве случаев артропатия исчезает в течение двух-четырех недель. В редких случаях симптомы периодически появляются вновь в течение нескольких лет. Поэтому в случае выявления хронической артропатии необходимо предполагать устойчивую инфекцию парвовирусом B19.

Угнетение эритропоэза (продолжительность 1–4 недели), который вызывается парвовирусом B19, у здоровых людей обычно остается субклиническим, но может привести к апластическому кризису у пациентов с хронической гемолитической анемией (серповидно-клеточная анемия, талассемия, дефицит пируваткиназы, сфероцитоз, аутоиммунная гемолитическая анемия). Таким пациентам необходимы переливание крови и обязательная госпитализация. Недавно были обнаружены дополнительные проявления заболевания, такие как дисфункция печени или миокардит, ассоциированный с B19.

Дальнейшие осложнения, вызываемые инфекцией B19, могут обнаруживаться у серонегативных беременных женщин. Парвовирус B19 может передаваться через плаценту в плод. Из-за короткой жизнеспособности эритроцитов до 20 недели беременности и потери достаточной иммунной защиты инфекция может привести к тяжелой острой или хронической анемии и как следствие к самопроизвольному аборту. Дальнейшее осложнение после инфекции во время второго триместра – развитие водянки плода. Однако более 80% беременностей протекают без осложнений. Эмбриопатии наблюдаются нечасто.

Антитела класса IgM обычно обнаруживаются с появлением симптомов, их определять возможно приблизительно через 10 дней после инфицирования. IgG-антитела выявляются на несколько дней позже. Обычно через 30–60 дней IgM антитела уже не обнаруживаются, но IgG антитела, как правило, остаются на всю жизнь.

Для быстрого количественного определения IgG антител подходит тест-система RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgG, в основе которой используются рекомбинантные пептиды VP1 и VP2. Кроме того, для подтверждения результатов ИФА-теста и более точного определения стадии заболевания, рекомендуется всегда использовать вестерн-блот, например, тест RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG/IgM (кат. L 6003), в котором используются различные рекомбинантные белки вирусного антигена.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

На поверхности лунок микропланшета иммобилизованы рекомбинантные антигены к парвовирусу B19. В лунки вносят разведенные образцы сыворотки крови и контроли и инкубируют при комнатной температуре. Присутствующие в сыворотке антитела связываются с иммобилизованными антигенами. Несвязавшийся материал удаляют промывкой.

На второй стадии конъюгированные с пероксидазой антитела добавляют к иммуноглобулинам G человека. После инкубации при комнатной температуре несвязавшийся конъюгат удаляют промывкой. В лунки добавляют субстрат (пероксид водорода) и хромоген (тетраметилбензидин (ТМБ)), и инкубируют при комнатной температуре. Фермент, связавшийся с лунками, превращает бесцветный субстрат/хромоген в окрашенный в синий цвет продукт. Добавление стоп-реагента меняет окраску с синего цвета на желтый. Измеряют оптическую плотность при длине волны 450 нм (дополнительно можно использовать длину волны сравнения ≥ 600 нм).

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: 96-луночный, в рамке-держателе, разделяемый на отдельные лунки, на дно лунок которых нанесен рекомбинантный антиген парвовируса B19; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
SeroPP	Буфер для разведения образцов: бычий сывороточный альбумин; NaCl (0,9%), 0,05% Твин 20, 0,01% тимерозал (мертиолят); готов к использованию	1 × 110 мл
SeroWP	Промывочный буфер: 10х концентрат; трис-солевой буфер; содержит 0,2% бромидокс-Л и 0,5% Твин 20	1 × 100 мл
Control IgG + зеленая крышка	Стандартный контроль IgG: разведенная сыворотка с IgG человека; содержит 0,01% тимерозал (мертиолят) и 0,05% Твин 20; окрашен в зеленый цвет; готов к использованию	1 × 2,5 мл
Control IgG -	Отрицательный контроль IgG: разведенная сыворотка, не содержащая IgG человека; содержит 0,01% тимерозал (мертиолят) и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 × 1,2 мл
Sero G LD	Конъюгат антител: антитела козы к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,01% метилизотиазолон, 0,01% бромнитродексан, 0,05% проклин 300; готов к использованию	1 × 12 мл
Sero SC	Субстратный раствор: пероксид водорода / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 × 12 мл
SeroStop	Стоп-реагент: 0,5 М раствор серной кислоты	1 × 12 мл
	Инструкция по применению	

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Влажная камера с температурой 37 °C
- Пробирки для разведения образцов
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 10 – 100 мкл и 100 – 1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

1. Контрольные сыворотки (стандартный и отрицательный контроли) были проверены на антитела к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на наличие антигена гепатита В; при этом показали отрицательные результаты. Однако как контроли, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
2. Стандартный контроль, отрицательный контроль и буфер для разведения образцов **SeroPP** содержат 0,01% тимерозал (мертиолят). Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
3. Промывочный буфер **SeroWP** содержит бромидокс-Л. Следует избегать его контакта с кожей или слизистыми.
4. Пероксид водорода может вызывать ожог. Обращайтесь с субстратом **SeroSC** осторожно!
5. Стоп-реагент **SeroStop** содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой!
6. Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C не менее одного часа.
7. Не допускается использование контролей из наборов других серий.

6. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Следует исключить микробную контаминацию. Качество набора гарантируется только до истечения его срока годности.

Разведенный промывочный буфер (**SeroWP**) можно хранить при температуре 2-8 °C до срока годности, указанного на этикетке флакона.

Перед использованием все реагенты и стрипы должны быть доведены до комнатной температуры (20-25 °C). Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной. Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застевку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °C.

Необходимо избегать контакта субстрата (**SeroSC**) с раствором конъюгата (**Sero G LD**), поскольку это приводит к окрашиванию субстрата. Субстрат бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить порчи или окрашивания из-за аутоокисления. Если субстрат приобрел голубую окраску, он становится непригодным для использования.

7. ПРИЗНАКИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ ПОРЧИ РЕАГЕНТОВ

Непригодность реагента можно установить по следующим признакам:

- помутнение или окрашивание в голубой цвет бесцветного субстрата до его использования;
- оптическая плотность (ОП) отрицательного контроля при 450/620 нм превышает 0,3;
- оптическая плотность (ОП) положительного контроля при 450/620 нм выходит за пределы значений, указанных в прилагаемой к набору таблице.

8. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

ИФА-тест RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgG предназначен для исследования образцов сыворотки крови человека.

Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, подвергшихся тепловой обработке, а также липемических, гемолизированных, желтушных и мутных образцов может привести к получению неверных результатов.

Если нет возможности провести исследование сразу, образцы следует хранить при температуре 2-8 °C не более 1 недели. Более длительное хранение допускается в замороженном состоянии при температуре минус 20 °C. Разведенные образцы можно хранить до 7 часов при температуре 2-8 °C.

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Иммуноферментные тест-системы RIDASCREEN® для определения антител содержат ряд общих реагентов. Эти реагенты имеют этикетки RIDASCREEN® Sero (SeroWP, SeroPP, Sero G LD, SeroSC, SeroStop). Они неспецифичны для конкретного набора и могут быть взаимозаменяемы с реагентами, имеющими аналогичные этикетки, из других наборов. Однако это не относится к контролям.

Перед использованием доведите все реагенты и стрипы до комнатной температуры (20-25 °C). Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Воспроизводимость в любом иммуноферментном анализе зависит от точности пипетирования, соблюдения времени и температуры инкубации, соблюдения последовательности промывок. Отклонения от приведенных в инструкции времени и температуры инкубации приводит к значительным отличиям оптической плотности стандартной контрольной сыворотки от заданных значений.

Во время промывки следите, чтобы все лунки заполнялись буфером, и чтобы жидкость полностью удалялась из лунок. Не допускайте высыхания лунок стрипов между операциями.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время инкубации. Рекомендуем закрывать микропланшет со стрипами крышкой.

Все реагенты, за исключением промывочного буфера, готовы к использованию.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Разведите концентрат промывочного буфера (**SeroWP**) дистиллированной водой в соотношении 1:10 (1 часть буфера на 9 частей дистиллированной воды). Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C.

Внесите 100 мл концентрированного промывочного буфера в мерный цилиндр объемом 1000 мл. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой. Готовый промывочный буфер можно хранить при температуре 2-8 °C в течение срока годности набора, указанного на этикетке флакона.

9.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите образцы сыворотки буфером для разведения образцов (**SeroPP**) в соотношении 1:100.

Разводить образцы сывороток для определения IgG-антител можно, например, следующим образом:

10 мкл образца сыворотки крови + 990 мкл буфера для разведения образцов

Внимание! Отрицательный и стандартный контроли, входящие в состав набора, готовы к использованию и не требуют разведения.

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку планшета необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 100 мкл разведенных образцов сыворотки крови или готовых к использованию контролей. Лунку A1 оставляют пустой (бланк). В каждом анализе следует отводить одну лунку для отрицательного контроля и две лунки для стандартного контроля. Инкубируйте планшет в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C. Дно камеры не должно соприкасаться с материалами, хорошо проводящими тепло (металлом или влажной бумагой).

A1	бланк
B1	отрицательный контроль
C1	стандартный контроль
D1	стандартный контроль
E1, F1	образцы сывороток крови пациентов 1, 2 и т.д.

Внимание! Планшет при проведении иммуноферментного анализа нельзя ставить в холодную инкубационную камеру, температура в которой будет повышаться до 37 °C во время инкубации. Температура в камере уже должна быть доведена до 37 °C к началу инкубации.

9.5. Промывка

Вылейте или удалите аспирацией содержимое лунок в пустой контейнер с дезинфицирующим раствором. Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Затем промойте все лунки 4 раза, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следите за тем, чтобы промывочное устройство подходило для планшетов этого типа.

9.6. Вторая инкубация

В каждую лунку (включая A1) внесите по 100 мкл **Sero G LD** (конъюгата антител к IgG человека). Инкубируйте планшет в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C.

9.7. Промывка

Промойте планшет 4 раза как описано в пункте 9.5.

9.6. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 100 мкл **SeroSC**. Инкубируйте планшет в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C. По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл **SeroStop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках с помощью планшетного спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм). Фоновое значение поглощения измеряется против бланка (лунка A1).

Примечание: Перед измерением протрите дно микропланшета, чтобы удалить влагу.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Доведите все реагенты до комнатной температуры.
2. Приготовьте промывочный буфер (разведением **SeroWP**).
3. Разведите образцы сыворотки крови.
4. Внесите в лунки по 100 мкл стандартного контроля, отрицательного контроля или разведенных образцов; инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C.
5. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку.
6. Добавьте по 100 мкл **Sero G LD**; инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C.
7. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку.
8. Внесите по 100 мкл **SeroSC**; инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C.
9. Добавьте по 100 мкл **SeroStop**, измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

10. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных может быть проведен тремя различными путями:

1. С использованием прилагающейся калибровочной кривой.
2. С использованием табличных значений (см. вкладыш к инструкции по применению).
3. Математическим путем с использованием 4-параметрического метода вычислений или α -метода.

До проведения анализа данных необходимо из всех значений ОП вычесть значение ОП бланка (лунки A1).

10.1. Контроль качества

Для контроля качества стандартный контроль (в дубликатах) и отрицательный контроль должны включаться в каждую серию определений. Тест считается выполненным правильно, если среднее значение оптическая плотность (ОП) стандартного контроля при 450/620 нм не выходит за пределы диапазона значений, указанных во вкладыше к инструкции по применению.

ОП отрицательного контроля должна обеспечивать отнесение его (при анализе результатов) к группе отрицательных проб.

Если ОП отдельных значений стандартного контроля отличается от средней оптической плотности более чем на 20%, тест следует повторить.

ОП отрицательного контроля при 450/620 нм должна быть ниже 0,3.

10.2. Анализ с использованием калибровочной кривой

Если необходимо провести анализ с использованием калибровочной кривой, обязательно следует вводить в тест стандартный контроль в дублях с тем, чтобы скорректировать вариабельность между измерениями, выполненными в разные дни (см. также п. 10.1.). По соотношению целевого значения ОП стандартного контроля и значения, полученного в тесте, вычисляется фактор коррекции F:

$$F = \frac{\text{целевое значение ОП стандартного контроля}}{\text{среднее измеренное значение ОП стандартного контроля}}$$

Целевое значение ОП стандартного контроля для данной серии приводится во вкладыше к инструкции по применению.

Все значения ОП образцов следует умножить на фактор F. По этим скорректированным значениям находят соответствующие значения в Ед/мл, вычисленные по калибровочной кривой для данной серии (приводится на вкладыше к инструкции по применению).

Качественную оценку полученных результатов (положительный (+), отрицательный (-) или неопределенный (?)) следует проводить по первому столбцу таблицы.

	Ед/мл	Диапазон оптических плотностей стандартного контроля
		1,00 – 1,05
-	< 3,0	< 0,11
?	3,0 – 5,0	0,11 – 0,17
	5,1 – 10,0	0,18 – 0,31
	10,1 – 30,0	0,32 – 0,68
+	30,1 – 50,0	0,69 – 0,95
	50,1 – 100,0	0,96 – 1,42
	100,1 – 200,0	1,43 – 2,09
	> 200,0	>2,09

Рис. 1. Пример определения IgG (из листовки-вкладыша к партии набора).

Приведенную таблицу следует использовать исключительно в качестве образца, значения в ней могут отличаться от данных в реальном листке-вкладыше из набора.

10.3. Анализ по табличным значениям

Исходя из среднего значения ОП стандартного контроля (см. также п. 10.1) определяют колонку диапазонов значений в прилагаемой таблице значений. Этой колонкой следует пользоваться при определении уровня антител в исследуемых пробах. В этой колонке находят диапазон оптической плотности пробы, соответствующий измеренным значениям, после чего в этой же строке в крайнем левом столбце находят концентрацию антител в Международных единицах МЕд/мл.

10.4. Математический расчет

Необходимые значения для математического расчета с использованием 4-параметрического метода вычислений или α -метода приведены во вкладыше к инструкции по применению.

10.5. Интерпретация результатов

Таблица 2. Интерпретация результатов определения антител.

	IgG
отрицательный	< 3,0 МЕд/мл
неопределенный	3,0 – 5,0 МЕд/мл
положительный	> 5,0 МЕд/мл

11. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

ИФА тест RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgG определяет IgG антитела к парвовирусу B19. Это исследование необходимо проводить при обоснованных подозрениях на наличие парвовирусной инфекции. При постановке диагноза, наряду с результатами теста, следует принимать во внимание всю совокупность клинических данных.

Отрицательные результаты не могут полностью исключить инфекцию. Из-за низкого титра антител на очень ранних стадиях инфекции тест может дать отрицательные результаты. Если существует клиническое подозрение, через две недели необходимо провести повторное исследование со свежеснятым образцом пациента.

В зависимости от возраста пациентов IgG антитела к парвовирусу B19 можно обнаружить у 40-70% популяции. Поэтому положительное определение иммуноглобулинов IgG само по себе не позволяет сделать вывод об остром заболевании.

Для получения более значимых результатов всегда необходимо исследовать два последовательно взятых образца сыворотки пациента. Изменение титра является важным показателем для интерпретации серологического исследования.

12. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 3. Вариации результатов, полученных в разных постановках анализа (n = 5).

Вариации в разных постановках анализа	IgG	
	ОП	CV
Сыворотка 1	0,240	9,3%
Сыворотка 2	0,789	8,2%
Сыворотка 3	1,203	8,1%

Таблица 4. Вариации результатов, полученных в одной постановке (n = 24).

Вариации в одной постановке анализа	IgG	
	ОП	CV
Сыворотка 1	0,161	5,5%
Сыворотка 2	0,585	7,2%
Сыворотка 3	1,889	6,3%

Таблица 5. Чувствительность и специфичность, полученные при сравнении с двумя другими коммерческими ИФА-наборами.

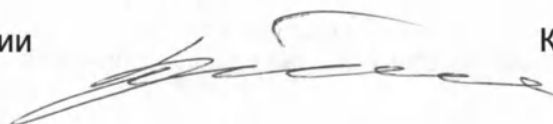
	IgG
Чувствительность	91,3%
Специфичность	100,0%

Таблица 6. Результаты тестирования образцов сыворотки 212 доноров крови (из центра донорства крови в Германии).

Образцы сыворотки 212 доноров крови	IgG
Отрицательные	31,0%
Неоднозначные	13,0%
Положительные	56,0%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано _____
прошнуровано _____
печатью 4



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

«12» ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**Набор реагентов для определения IgM антител к парвовирусу B19****(RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgM)****производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)****RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgM**

Иммуноферментный тест для количественного определения IgG-антител к парвовирусу B19.

Набор рассчитан на 96 определений**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Иммуноферментный тест RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgM предназначен для количественного определения специфических IgG антител к парвовирусу B19 в сыворотке крови человека.

2. ВВЕДЕНИЕ

Человеческий парвовирус B19 был открыт Cossart и соавт. в Англии в 1975 г. Эти авторы открыли вирус при исследовании сывороток крови доноров на наличие гепатита В. Случайно обнаруженный изолят был назван B19.

Парвовирус B19 – небольшой, безоболочечный ДНК-вирус диаметром 18-26 нм. Геном состоит из одноцепочечной ДНК длиной 5,4 тыс. оснований. Капсид состоит из двух полипептидных белков 84 кДа и 58 кДа (VP1 и VP2). Кроме того, основной неструктурный белок (NS-1) кодируется в геноме; он необходим для репликации и размножения вируса. Вирус B19 имеет икосаэдрическую структуру и обладает высокой термостабильностью. Он может выдерживать нагревание при 60 °С до 12 часов.

В род парвовирусов входят (близкие к единственно известному человеческому парвовирусу B19) патогены животных, такие как парвовирус собаки и кошачий вирус панлейкопении. Вместе с денсовирусами и депендоввирусами, которые для репликации нуждаются в вирусах-помощниках (аденовирус или вирус герпеса), парвовирусы образуют семейство *Parvoviridae*.

Одной из важных характеристик парвовирусов является их способность селективно реплицироваться в делящихся клетках (костного мозга, кишечника, эмбриональных клетках).

Инфицирование широко распространенным парвовирусом B19 человека чаще всего отмечается зимой или ранним летом. Они могут перерасти в эпидемию, в особенности в медицинских учреждениях и школах. Передача происходит в основном через дыхательную систему (воздушно-капельный путь), но также через кровь или продукты из крови. Инфицирование парвовирусом наблюдается во всех возрастных группах, но наиболее часто встречается в возрасте от 6 до 15 лет. Частота заболевания увеличивается с возрастом и достигает 40-70% у взрослых. У женщин заболевание встречается чаще, чем у мужчин.

Инкубационный период длится 1-3 недели. Виремическая фаза ограничивается 3-7 днями. В это время у пациента могут отсутствовать симптомы заболевания или он может жаловаться на некоторые предшествующие болезни симптомы, такие как головная боль, зуд, боль в мышцах и лихорадка.

Приблизительно через две недели после инфицирования может появиться инфекционная эритема (пятая болезнь). У детей обычно появляется типичная экзантема (покраснение щек, сеткообразная фебрильная пурпура, в особенности на разгибательной поверхности конечностей), но эти признаки скорее нетипичны для взрослых. Дальнейшими симптомами инфекции B19 являются боль в суставах и артрит (60%), респираторные симптомы (22%), а также диарея (15-35%). Только в 20% всех случаев инфицирования парвовирусом B19 симптомы заболевания отсутствуют. У женщин боли в суставах встречаются в два раза чаще, чем у мужчин. В большинстве случаев артропатия исчезает в течение двух-четырех недель. В редких случаях симптомы периодически появляются вновь в течение нескольких лет. Поэтому в случае выявления хронической артропатии необходимо предполагать устойчивую инфекцию парвовирусом B19.

Угнетение эритропоэза (продолжительность 1-4 недели), который вызывается парвовирусом B19, у здоровых людей обычно остается субклиническим, но может привести к апластическому кризису у пациентов с хронической гемолитической анемией (серповидно-клеточная анемия, талассемия, дефицит пируваткиназы, сфероцитоз, аутоиммунная гемолитическая анемия). Таким пациентам необходимы переливание крови и обязательная госпитализация. Недавно были обнаружены дополнительные проявления заболевания, такие как дисфункция печени или миокардит, ассоциированный с B19.

Дальнейшие осложнения, вызываемые инфекцией B19, могут обнаруживаться у серонегативных беременных женщин. Парвовирус B19 может передаваться через плаценту в плод. Из-за короткой жизнеспособности эритроцитов до 20 недели беременности и потери достаточной иммунной защиты инфекция может привести к тяжелой острой или хронической анемии и как следствие к самопроизвольному аборту. Дальнейшее осложнение после инфекции во время второго триместра – развитие водянки плода. Однако более 80% беременностей протекают без осложнений. Эмбриопатии наблюдаются нечасто.

Антитела класса IgM обычно обнаруживаются с появлением симптомов, их определять возможно приблизительно через 10 дней после инфицирования. IgG-антитела выявляются на несколько дней позже. Обычно через 30-60 дней IgM антитела уже не обнаруживаются, но IgG антитела, как правило, остаются на всю жизнь.

Для быстрого количественного определения IgG антител подходит тест-система RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgM, в основе которой используются рекомбинантные пептиды VP1 и VP2. Кроме того, для подтверждения результатов ИФА-теста и более точного определения стадии заболевания, рекомендуется всегда использовать вестерн-блот, например, тест RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG/IgM (кат. L 6003), в котором используются различные рекомбинантные белки вирусного антигена.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

На поверхности лунок микропланшета иммобилизованы рекомбинантные антигены к парвовирусу B19. В лунки вносят разведенные образцы сыворотки крови и контроли и инкубируют при комнатной температуре. Присутствующие в сыворотке антитела связываются с иммобилизованными антигенами. Несвязавшийся материал удаляют промывкой.

На второй стадии конъюгированные с пероксидазой антитела добавляют к иммуноглобулинам G человека. После инкубации при комнатной температуре несвязавшийся конъюгат удаляют промывкой. В лунки добавляют субстрат (пероксид водорода) и хромоген (тетраметилбензидин (ТМБ)), и инкубируют при комнатной температуре. Фермент, связавшийся с лунками, превращает бесцветный субстрат/хромоген в окрашенный в синий цвет продукт. Добавление стоп-реагента меняет окраску с синего цвета на желтый. Измеряют оптическую плотность при длине волны 450 нм (дополнительно можно использовать длину волны сравнения ≥ 600 нм).

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: 96-луночный, в рамке-держателе, разделяемый на отдельные лунки, на дно лунок которых нанесен рекомбинантный антиген парвовируса B19; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
SeroPP	Буфер для разведения образцов: бычий сывороточный альбумин; NaCl (0,9%), 0,05% Твин 20, 0,01% тимерозал (мертиолят); готов к использованию	1 × 110 мл
SeroWP	Промывочный буфер: 10х концентрат; трис-солевой буфер; содержит 0,2% бромидокс-Л и 0,5% Твин 20	1 × 100 мл
Control IgM + <i>зеленая крышка</i>	Стандартный контроль IgG: разведенная сыворотка с IgG человека; содержит 0,01% тимерозал (мертиолят) и 0,05% Твин 20; окрашен в зеленый цвет; готов к использованию	1 × 2,5 мл
Control IgM -	Отрицательный контроль IgG: разведенная сыворотка, не содержащая IgG человека; содержит 0,01% тимерозал (мертиолят) и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 × 1,2 мл
Sero M LD	Конъюгат антител: антитела козы к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,01% метилизотиазолон, 0,01% бромнитродексан, 0,05% проклин 300; готов к использованию	1 × 12 мл
Sero SC	Субстратный раствор: пероксид водорода / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 × 12 мл
SeroStop	Стоп-реагент: 0,5 М раствор серной кислоты	1 × 12 мл
	Инструкция по применению	

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Влажная камера с температурой 37 °C
- Пробирки для разведения образцов
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 10 – 100 мкл и 100 - 1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

1. Контрольные сыворотки (стандартный и отрицательный контроли) были проверены на антитела к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на наличие антигена гепатита В; при этом показали отрицательные результаты. Однако как контроли, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
2. Стандартный контроль, отрицательный контроль и буфер для разведения образцов **SeroPP** содержат 0,01% тимерозал (мертиолят). Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
3. Промывочный буфер **SeroWP** содержит брioniдокс-Л. Следует избегать его контакта с кожей или слизистыми.
4. Пероксид водорода может вызывать ожог. Обращайтесь с субстратом **SeroSC** осторожно!
5. Стоп-реагент **SeroStop** содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой!
6. Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C не менее одного часа.
7. Не допускается использование контролей из наборов других серий.

6. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Следует исключить микробную контаминацию. Качество набора гарантируется только до истечения его срока годности.

Разведенный промывочный буфер (**SeroWP**) можно хранить при температуре 2-8 °C до срока годности, указанного на этикетке флакона.

Перед использованием все реагенты и стрипы должны быть доведены до комнатной температуры (20-25 °C). Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной. Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застёжку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °C.

Необходимо избегать контакта субстрата (**SeroSC**) с раствором конъюгата (**Sero M LD**), поскольку это приводит к окрашиванию субстрата. Субстрат бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить порчи или окрашивания из-за аутоокисления. Если субстрат приобрел голубую окраску, он становится непригодным для использования.

7. ПРИЗНАКИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ ПОРЧИ РЕАГЕНТОВ

Непригодность реагента можно установить по следующим признакам:

- помутнение или окрашивание в голубой цвет бесцветного субстрата до его использования;
- оптическая плотность (ОП) отрицательного контроля при 450/620 нм превышает 0,3;
- оптическая плотность (ОП) положительного контроля при 450/620 нм выходит за пределы значений, указанных в прилагаемой к набору таблице.

8. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

ИФА-тест RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgM предназначен для исследования образцов сыворотки крови человека.

Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, подвергшихся тепловой обработке, а также липемических, гемолизированных, желтушных и мутных образцов может привести к получению неверных результатов.

Если нет возможности провести исследование сразу, образцы следует хранить при температуре 2-8 °C не более 1 недели. Более длительное хранение допускается в замороженном состоянии при температуре минус 20 °C. Разведенные образцы можно хранить до 7 часов при температуре 2-8 °C.

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Иммуноферментные тест-системы RIDASCREEN® для определения антител содержат ряд общих реагентов. Эти реагенты имеют этикетки RIDASCREEN® Sero (SeroWP, SeroPP, Sero M LD, SeroSC, SeroStop). Они неспецифичны для конкретного набора и могут быть взаимозаменяемы с реагентами, имеющими аналогичные этикетки, из других наборов. Однако это не относится к контролям.

Перед использованием доведите все реагенты и стрипы до комнатной температуры (20-25 °C). Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Воспроизводимость в любом иммуноферментном анализе зависит от точности пипетирования, соблюдения времени и температуры инкубации, соблюдения последовательности промывок. Отклонения от приведенных в инструкции времени и температуры инкубации приводит к значительным отличиям оптической плотности стандартной контрольной сыворотки от заданных значений.

Во время промывки следите, чтобы все лунки заполнялись буфером, и чтобы жидкость полностью удалялась из лунок. Не допускайте высыхания лунок стрипов между операциями.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время инкубации. Рекомендуем закрывать микропланшет со стрипами крышкой.

Все реагенты, за исключением промывочного буфера, готовы к использованию.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Разведите концентрат промывочного буфера (**SeroWP**) дистиллированной водой в соотношении 1:10 (1 часть буфера на 9 частей дистиллированной воды). Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C.

Внесите 100 мл концентрированного промывочного буфера в мерный цилиндр объемом 1000 мл. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой. Готовый промывочный буфер можно хранить при температуре 2-8 °C в течение срока годности набора, указанного на этикетке флакона.

9.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите образцы сыворотки буфером для разведения образцов (**SeroPP**) в соотношении 1:100.

Разводить образцы сывороток для определения IgG-антител можно, например, следующим образом:

10 мкл образца сыворотки крови + 990 мкл буфера для разведения образцов

Внимание!

Отрицательный и стандартный контроли, входящие в состав набора, готовы к использованию и не требуют разведения.

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку планшета необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 100 мкл разведенных образцов сыворотки крови или готовых к использованию контролей. Лунку A1 оставляют пустой (бланк). В каждом анализе следует отводить одну лунку для отрицательного контроля и две лунки для стандартного контроля. Инкубируйте планшет в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C. Дно камеры не должно соприкасаться с материалами, хорошо проводящими тепло (металлом или влажной бумагой).

A1	бланк
B1	отрицательный контроль
C1	стандартный контроль
D1	стандартный контроль
E1, F1	образцы сывороток крови пациентов 1, 2 и т.д.

Внимание!

Планшет при проведении иммуноферментного анализа нельзя ставить в холодную инкубационную камеру, температура в которой будет повышаться до 37 °C во время инкубации. Температура в камере уже должна быть доведена до 37 °C к началу инкубации.

9.5. Промывка

Вылейте или удалите аспирацией содержимое лунок в пустой контейнер с дезинфицирующим раствором. Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Затем промойте все лунки 4 раза, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следите за тем, чтобы промывочное устройство подходило для планшетов этого типа.

9.6. Вторая инкубация

В каждую лунку (включая A1) внесите по 100 мкл **Sero M LD** (конъюгата антител к IgG человека). Инкубируйте планшет в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C.

9.7. Промывка

Промойте планшет 4 раза как описано в пункте 9.5.

9.6. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 100 мкл **SeroSC**. Инкубируйте планшет в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C. По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл **SeroStop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках с помощью планшетного спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм). Фоновое значение поглощения измеряется против бланка (лунка A1).

Примечание: Перед измерением протрите дно микропланшета, чтобы удалить влагу.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Доведите все реагенты до комнатной температуры.
2. Приготовьте промывочный буфер (разведением **SeroWP**).
3. Разведите образцы сыворотки крови.
4. Внесите в лунки по 100 мкл стандартного контроля, отрицательного контроля или разведенных образцов; инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C.
5. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку.
6. Добавьте по 100 мкл **Sero M LD**; инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C.
7. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 4 раза, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку.
8. Внесите по 100 мкл **SeroSC**; инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C.
9. Добавьте по 100 мкл **SeroStop**, измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

10. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных может быть проведен тремя различными путями:

1. С использованием прилагающейся калибровочной кривой.
2. С использованием табличных значений (см. вкладыш к инструкции по применению).
3. Математическим путем с использованием 4-параметрического метода вычислений или α -метода.

До проведения анализа данных необходимо из всех значений ОП вычесть значение ОП бланка (лунки A1).

10.1. Контроль качества

Для контроля качества стандартный контроль (в дубликатах) и отрицательный контроль должны включаться в каждую серию определений. Тест считается выполненным правильно, если среднее значение оптическая плотность (ОП) стандартного контроля при 450/620 нм не выходит за пределы диапазона значений, указанных во вкладыше к инструкции по применению.

ОП отрицательного контроля должна обеспечивать отнесение его (при анализе результатов) к группе отрицательных проб.

Если ОП отдельных значений стандартного контроля отличается от средней оптической плотности более чем на 20%, тест следует повторить.

ОП отрицательного контроля при 450/620 нм должна быть ниже 0,3.

10.2. Анализ с использованием калибровочной кривой

Если необходимо провести анализ с использованием калибровочной кривой, обязательно следует вводить в тест стандартный контроль в дублях с тем, чтобы скорректировать вариабельность между измерениями, выполненными в разные дни (см. также п. 10.1.). По соотношению целевого значения ОП стандартного контроля и значения, полученного в тесте, вычисляется фактор коррекции F:

$$F = \frac{\text{целевое значение ОП стандартного контроля}}{\text{среднее измеренное значение ОП стандартного контроля}}$$

Целевое значение ОП стандартного контроля для данной серии приводится во вкладыше к инструкции по применению.

Все значения ОП образцов следует умножить на фактор F. По этим скорректированным значениям находят соответствующие значения в Ед/мл, вычисленные по калибровочной кривой для данной серии (приводится на вкладыше к инструкции по применению).

Качественную оценку полученных результатов (положительный (+), отрицательный (-) или неопределенный (?)) следует проводить по первому столбцу (см. рис. 1).

	Ед/мл	Диапазон оптических плотностей стандартного контроля
		1,00 – 1,05
-	< 3,0	< 0,11
?	3,0 – 5,0	0,11 – 0,17
	5,1 – 10,0	0,18 – 0,31
	10,1 – 30,0	0,32 – 0,68
+	30,1 – 50,0	0,69 – 0,95
	50,1 – 100,0	0,96 – 1,42
	100,1 – 200,0	1,43 – 2,09
	> 200,0	>2,09

Рис. 1. Пример определения IgG (из листовки-вкладыша к партии набора).

Приведенную таблицу следует использовать исключительно в качестве образца, значения в ней могут отличаться от данных в реальном листке-вкладыше из набора.

10.3. Анализ по табличным значениям

Исходя из среднего значения ОП стандартного контроля (см. также п. 10.1) определяют колонку диапазонов значений в прилагаемой таблице значений. Этой колонкой следует пользоваться при определении уровня антител в исследуемых пробах. В этой колонке находят диапазон оптической плотности пробы, соответствующий измеренным значениям, после чего в этой же строке в крайнем левом столбце находят концентрацию антител в Международных единицах МЕд/мл.

10.4. Математический расчет

Необходимые значения для математического расчета с использованием 4-параметрического метода вычислений или α -метода приведены во вкладыше к инструкции по применению.

10.5. Интерпретация результатов

Таблица 2. Интерпретация результатов определения антител.

	IgM
отрицательный	< 10,0 МЕд/мл
неопределенный	10,0 – 12,0 МЕд/мл
положительный	< 12,0 МЕд/мл

11. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

ИФА тест RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgM определяет IgM антитела к парвовирусу B19. Это исследование необходимо проводить при обоснованных подозрениях на наличие парвовирусной инфекции. При постановке диагноза, наряду с результатами теста, следует принимать во внимание всю совокупность клинических данных.

Отрицательные результаты не могут полностью исключить инфекцию. Из-за низкого титра антител на очень ранних стадиях инфекции тест может дать отрицательные результаты. Если существует клиническое подозрение, через две недели необходимо провести повторное исследование со свежеснятым образцом пациента.

В зависимости от возраста пациентов IgG антитела к парвовирусу B19 можно обнаружить у 40-70% популяции. Поэтому положительное определение иммуноглобулинов IgG само по себе не позволяет сделать вывод об остром заболевании.

Для получения более значимых результатов всегда необходимо исследовать два последовательно взятых образца сыворотки пациента. Изменение титра является важным показателем для интерпретации серологического исследования.

12. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 3. Вариации результатов, полученных в разных постановках анализа (n = 5).

Вариации в разных постановках анализа	IgM	
	ОП	CV
Сыворотка 1	0,222	7,8%
Сыворотка 2	0,478	8,6%
Сыворотка 3	1,462	7,7%

Таблица 4. Вариации результатов, полученных в одной постановке (n = 24).

Вариации в одной постановке анализа	IgM	
	ОП	CV
Сыворотка 1	0,202	5,2%
Сыворотка 2	0,398	4,8%
Сыворотка 3	1,246	5,5%

Таблица 5. Чувствительность и специфичность, полученные при сравнении с двумя другими коммерческими ИФА-наборами.

	IgM
Чувствительность	91,7%
Специфичность	93,8%

Таблица 6. Результаты тестирования образцов сыворотки 212 доноров крови (из центра донорства крови в Германии).

Образцы сыворотки 212 доноров крови	IgM
Отрицательные	99,0%
Неоднозначные	0,0%
Положительные	1,0%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»М.И. Грищепа
«10» ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения IgG и IgM антител к парвовирусу B19
(RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG/IgM)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG/IgM

Иммуноблот для определения IgG- и IgM-антител к парвовирусу B19 в сыворотке или плазме крови.

Набор рассчитан на 20 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG/IgM – качественный тест для обнаружения и идентификации *in vitro* антител (IgM и IgG) к парвовирусу B19 в сыворотке или плазме крови человека. Благодаря электрофоретическому разделению рекомбинантных компонентов белков вируса этот тест, в противоположность другим методам, позволяет судить о присутствии антител к различным эпитопам вируса, наличие которых коррелирует с разными стадиями заболевания.

2. ВВЕДЕНИЕ

Человеческий парвовирус B19 был открыт Cossart и соавт. в Англии в 1975 г. Эти авторы открыли вирус при исследовании сывороток крови доноров на наличие гепатита В. Случайно обнаруженный изолят был назван B19 (1).

Парвовирус B19 – небольшой, безоболочечный ДНК-вирус с диаметром 18-26 нм. Геном состоит из одноцепочечной ДНК длиной 5,4 тыс. оснований. Капсид состоит из двух полипептидных белков 84 кДа и 58 кДа (VP1 и VP2). Оба структурных белка кодируются в одной и той же рамке считывания генома вируса, в соответствии с чем у более короткого VP2 начало транскрипции находится в рамке считывания VP1. Это означает, что оба белка идентичны, за исключением добавочной N-концевой части VP1 размером около 26 кДа. Кроме того, в геноме кодируется основной неструктурный белок (NS-1); он необходим для репликации и размножения вируса. Вирус B19 имеет икосаэдрическую структуру и очень термостабилен. Он может выдерживать нагревание при 60 °C до 12 часов.

В род парвовирусов входят (близкие к единственно известному человеческому парвовирусу B19) патогены животных, такие как парвовирус собаки и кошачий вирус панлейкопении. Вместе с денсовирусами и депендовирусами, которые для репликации нуждаются в вирусах-помощниках (аденовирус или вирус герпеса), парвовирусы образуют семейство *Parvoviridae*.

Одной из важных характеристик парвовирусов является их способность селективно реплицироваться в делящихся клетках (костного мозга, кишечника, эмбриональных клетках).

Инфицирование широко распространенным парвовирусом B19 человека чаще всего отмечается зимой или ранним летом. Они могут перерасти в эпидемию, в особенности в медицинских учреждениях и школах. Передача происходит в основном через дыхательную систему (воздушно-капельный путь), но также через кровь или продукты из крови. Инфицирование парвовирусом наблюдается во всех возрастных группах, но наиболее часто встречается в возрасте от 6 до 15 лет. Частота заболевания увеличивается с возрастом и достигает 40-70% у взрослых. У женщин заболевание встречается чаще, чем у мужчин.

Инкубационный период длится 1-3 недели. Виремическая фаза ограничивается 3-7 днями. В это время у пациента могут отсутствовать симптомы заболевания или он может жаловаться на некоторые предшествующие болезни симптомы, такие как головная боль, зуд, боль в мышцах и лихорадка.

Приблизительно через две недели после инфицирования может появиться инфекционная эритема (пятая болезнь). У детей обычно появляется типичная экзантема (покраснение щек, сеткообразная фебрильная пурпура, в особенности на разгибательной поверхности конечностей), но эти признаки скорее нетипичны для взрослых. Дальнейшими симптомами инфекции B19 являются боль в суставах и артрит (60%),

респираторные симптомы (22%), а также диарея (15-35%). Только в 20% всех случаев инфицирования парвовирусом B19 симптомы заболевания отсутствуют. У женщин боли в суставах встречаются в два раза чаще, чем у мужчин. В большинстве случаев артропатия исчезает в течение двух-четырех недель. В редких случаях симптомы периодически появляются вновь в течение нескольких лет. Поэтому в случае выявления угнетения эритропоэза (продолжительность 1-4 недели), который вызывается парвовирусом B19, у здоровых людей обычно остается субклиническим, но может привести к апластическому кризису у пациентов с хронической гемолитической анемией (серповидно-клеточная анемия, талассемия, дефицит пируваткиназы, сфероцитоз, аутоиммунная гемолитическая анемия). Таким пациентам необходимы переливание крови и обязательная госпитализация. Недавно были обнаружены дополнительные проявления заболевания, такие как дисфункция печени или миокардит, ассоциированный с B19.

Дальнейшие осложнения, вызываемые инфекцией B19, могут обнаруживаться у серонегативных беременных женщин. Парвовирус B19 может передаваться через плаценту в плод. Из-за короткой жизнеспособности эритроцитов до 20 недели беременности и потери достаточной иммунной защиты инфекция может привести к тяжелой острой или хронической анемии и как следствие к самопроизвольному аборту. Дальнейшее осложнение после инфекции во время второго триместра – развитие водянки плода. Однако более 80% беременностей протекают без осложнений. Эмбриопатии наблюдаются нечасто.

Антитела класса IgM обычно обнаруживаются с появлением симптомов, их определять возможно приблизительно через 10 дней после инфицирования. IgG-антитела выявляются на несколько дней позже. Обычно через 30-60 дней IgM антитела уже не обнаруживаются, но IgG антитела, как правило, остаются на всю жизнь.

Для быстрого количественного определения IgG антител подходит тест-система RIDASCREEN® Parvovirus IgG, в основе которой используются рекомбинантные пептиды VP1 и VP2. Кроме того, для подтверждения результатов ИФА-теста и более точного определения стадии заболевания рекомендуется всегда использовать вестерн-блот, например, тест RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG/IgM (кат. L 6003), в котором используются различные рекомбинантные белки вирусного антигена.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

В тесте RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG/IgM используются 4 рекомбинантных антигена парвовируса B19, продуцированные *E. coli*. Они включают фрагменты двух структурных белков VP1 и VP2 и основного неструктурного белка NS-1 (см. п. 12).

Очищенные (свободные от белков-продуктов слияния генов) рекомбинантные антигены разделяли методом электрофореза по молекулярной массе и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану разрезали на отдельные полоски (стрипы) для иммуноблота. Стрипы инкубируют с исследуемым образцом сыворотки или плазмы крови. Во время инкубации специфические антитела, присутствующие в образце, связываются с соответствующими белковыми полосами. После удаления несвязавшихся антител на стадии промывки проводят вторую инкубацию с конъюгатом пероксидазы и антител к IgM или IgG человека и последующую цветную реакцию, в результате которой специфически связанные антитела к четырем антигенам парвовируса B19 обнаруживаются в виде синих полос на тестовых стрипах.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 20 определений).

STRIP	Тестовые стрипы: 10 полосок, покрытых рекомбинантными антигенами парвовируса B19; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	20 опред.
Wash/Diluent 5x	Буфер для промывания/разведения: 5x концентрат; содержит трис-буфер, NaCl, Твин 20, бычий сывороточный альбумин	1 × 100 мл
Low control IgM + красная крышка	Низкий положительный контроль с содержанием IgM: сыворотка крови человека; содержит < 0,1% NaN ₃	1 × 80 мкл
Low control IgG + белая крышка	Низкий положительный контроль с содержанием IgG: сыворотка крови человека; содержит < 0,1% NaN ₃	1 × 80 мкл
Control – синяя крышка	Отрицательный контроль: сыворотка крови человека, не содержащая IgM и IgG человека; содержит < 0,1% NaN ₃	1 × 80 мкл
Conjugate IgM 100x фиолетовая крышка	Конъюгат антител к IgM человека: 100x концентрат; кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена; содержит NaN ₃	1 × 500 мкл
Conjugate IgG 100x зеленая крышка	Конъюгат антител к IgG человека: 100x концентрат; кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена; содержит NaN ₃	1 × 500 мкл
Substrate	Субстратный раствор: содержит тетраметилбензидин (TMB); готов к использованию	1 × 40 мл

	Инкубационные контейнеры с десятью ячейками в каждом	2
	Контрольный стрип (специфичный для данного лота набора)	1
	Бланк для протокола исследования	2
	Инструкция по применению	1

5. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

5.1. Реагенты

Деионизированная вода.

5.2. Оборудование

- Вакуумный насос для удаления жидкости из инкубационных ячеек
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 2 - 10 мкл, 10 - 100 мкл и 2 мл
- Мерные цилиндры объемом 100 и 500 мл
- Шейкер
- Пластиковый пинцет для работы со стрипами

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Тест предназначен только для *in vitro* диагностики.

Постановка исследования может осуществляться только опытным лабораторным персоналом. Соблюдайте, пожалуйста, меры безопасности при работе в клинической лаборатории. Строго следуйте настоящей инструкции по применению.

Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищу во время исследования. Избегайте контакта реагентов и проб с кожей и слизистыми. Пользуйтесь при работе специальной одеждой и одноразовыми перчатками.

Контрольные сыворотки (положительный и отрицательный контроли) были протестированы на наличие антител к ВИЧ 1+2 и поверхностного антигена гепатита В (HBsAg). Были получены отрицательные результаты. Тем не менее, с этими материалами, а также с образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфицированными.

Конъюгат и контроли содержат азид натрия. Необходимо исключить его контакт с кожей и слизистыми. При контакте со свинцовыми и медными деталями водопровода могут образовываться взрывоопасные соли металлов.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или автоклавировать при 121 °C не менее 1 часа.

7. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать только до истечения срока годности, указанного на этикетках флаконов. Не допускайте использование отдельных реагентов аналогичного набора из другой партии. Необходимо исключить микробную контаминацию. Концентрированные конъюгаты и буфер необходимо развести в достаточном количестве непосредственно перед постановкой исследования.

8. ПРИЗНАКИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ ПОРЧИ РЕАГЕНТОВ

На непригодность реагентов могут указывать отсутствие инкубационной контрольной полосы или полос положительных контролей, что не соответствует критериям, указанным в п. 11. Качество набора гарантируется только до истечения его срока годности.

9. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Тест RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG/IgM предназначен для исследования образцов сыворотки или плазмы крови человека. Инактивированные нагреванием образцы могут давать более высокий фон. Следует исключить повторное оттаивание и замораживание образцов, а также микробное загрязнение. Использование липемических образцов, а также образцов с признаками гемолиза или мутных может привести к ошибочным результатам.

Материал для образцов можно хранить до двух недель при 2-8 °C, если тест не может быть выполнен сразу. Возможно более длительное хранение образцов при -20 °C.

10. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

10.1. Предварительные комментарии

Перед использованием прогрейте все компоненты набора до комнатной температуры по крайней мере в течение 30 минут. Флаконы со стрипами следует открывать только после прогревания, чтобы избежать образования конденсата. Стрипы, которые не понадобятся в исследовании, оставляют во флаконе и продолжают хранить при 2-8 °C (флакон необходимо плотно закрыть), стрипы перед использованием должны оставаться сухими!

Стрипы необязательно использовать в соответствии с их нумерацией. Но важно записывать, какой стрип инкубировали с соответствующим образцом.

Воспроизводимость результатов вестерн-блота очень сильно зависит от правильности процедуры промывки. Следует неукоснительно придерживаться стадий промывки, описанных ниже.

Внимание!

Перед тем, как открыть маленькие пробирки, используемые в тесте, отцентрифугируйте их короткое время, чтобы жидкость собралась на дне пробирок и не было потерь!

10.2. Приготовление рабочего раствора буфера для промывки и разведения

Концентрированный буфер содержит растворимый белок. Перед использованием его необходимо перемешать и убедиться в гомогенности раствора. Буфер используют для разведения образцов и приготовления растворов конъюгата.

Для работы используют только свежеприготовленный буфер для промывки и разведения. Необходимо заранее рассчитать его объем для анализа соответствующего количества тестов. Разведенный буфер не стабилен. Неиспользованный буфер уничтожают.

Одну часть концентрированного буфера разводят четырьмя частями деионизированной воды (разведение 1:5).

Таблица 2. Объем буфера для промывки и разведения в расчете на используемые стрипы.

Используемые стрипы	Концентрированный буфер для промывания и разведения	Деионизированная вода	Количество готового к использованию буфера
2	10 мл	40 мл	50 мл
5	25 мл	100 мл	125 мл
10	50 мл	200 мл	250 мл
15	75 мл	300 мл	375 мл
20	100 мл	400 мл	500 мл

10.3. Первая инкубация

Для каждого определения используйте одну ячейку в инкубационном контейнере. Заполните ячейку 2 мл разведенного буфера для промывания и разведения. Для каждого определения извлеките из флакона с помощью пинцета (прикасайтесь к стрипам только с конца, на котором присутствует нумерация) один стрип. Погрузите стрип в буфер. Стрипы должны полностью пропитаться буфером.

Нумерация стрипов должна быть возрастающей.

20 мкл неразведенного образца (сыворотки или плазмы крови) или соответствующее количество низких положительных контролей (низкий положительный контроль IgG или низкий положительный контроль IgM) и отрицательного контроля добавляют в соответствующие ячейки. Низкий положительный контроль необходимо использовать при каждом выполнении теста независимо от того, какое количество сыворотки исследуется. Следите за тем, чтобы в ячейку не попадало содержимое соседних ячеек, так как это может привести к получению ошибочных результатов. Во время инкубации контейнер необходимо закрывать крышкой, которая поставляется с набором.

Стрипы с образцами помещают на горизонтальный шейкер и инкубируют в течение ночи (10-16 часов) при комнатной температуре (20-25 °C).

10.4. Промывка

Удалите жидкость (с помощью аспиратора), желательно с применением прикрепленной дезинфекционной ловушки. Промойте стрипы в течение 5 минут, добавляя к каждому из них по 2 мл разведенного буфера для промывания и разведения. Поместите инкубационный контейнер на шейкер. Повторите процедуру промывки три раза. Между стадиями промывки необходимо отсасывать буфер из ячеек.

Внимание!

Раствор конъюгата необходимо готовить во время последней стадии промывки.

10.5. Приготовление раствора конъюгата

С набором поставляются концентраты конъюгатов (Conjugate IgM/100x и Conjugate IgG/100x). Для использования в тесте его необходимо развести готовым к использованию буфером для промывки и разведения. Так как разведенный конъюгат стабилен в течение ограниченного времени, его необходимо готовить непосредственно перед использованием.

Нужно приготовить разведение 1:100, поэтому к одной части концентрата конъюгата (IgG или IgM соответственно) добавляется 99 частей готового буфера для промывки/разведения. Необходимый объем конъюгата в соответствии с используемым количеством стрипов приведен в таблице 3. Объемы реагентов для количества стрипов, которых нет в таблице, рассчитываются самостоятельно.

Таблица 3. Приготовление готового к использованию раствора конъюгата (IgG и/или IgM).

Количество используемых стрипов *	Концентрированный конъюгат IgG или IgM соответственно	Готовый к использованию буфер для промывки/разведения
1	20 мкл	2 мл
2	40 мкл	4 мл
3	60 мкл	6 мл
5	100 мкл	10 мл
10	200 мкл	20 мл
15	300 мкл	30 мл
20	400 мкл	40 мл

* Необходимые объемы реагентов были рассчитаны без учета «мертвого» объема автоматических систем. Если требуется приготовить реагенты для автоматического выполнения анализа, нужно приготовить количество конъюгата из расчета на 1-3 стрипа больше.

10.6. Вторая инкубация

Добавьте к каждому стрипу по 2 мл соответствующего готового к использованию раствора конъюгата. Инкубируйте стрипы на горизонтальном шейкере при комнатной температуре в течение 1 часа.

10.7. Промывка

Последовательность промывки: см. п. 10.4.

10.8. Третья инкубация

Добавьте к каждому стрипу по 1,5 мл раствора субстрата. Инкубируйте стрипы в течение 5-15 минут при комнатной температуре до тех пор, пока интенсивность полос с низкими положительными контролями не будет соответствовать критериям, указанным в п. 11. После этого субстрат удаляют. Для остановки реакции стрипы, все еще находящиеся в своих ячейках, ополаскивают 3 раза деионизированной водой.

Стрипы осторожно вынимают из ячеек с помощью пинцета. Чтобы высушить стрипы, их помещают между листами фильтровальной бумаги. После сушки их можно проанализировать.

Внимание! Сильно положительные сыворотки могут вызвать чересчур интенсивное развитие окраски. В таких случаях рекомендуется остановить реакцию раньше.

Краткая процедура исследования

1. Прогрейте все реагенты до комнатной температуры.
2. Внесите в каждую ячейку по 2 мл буфера для промывки и разведения.
3. Поместите в каждую ячейку по одному стрипу.
4. Добавьте 20 мкл образца, низкий положительный контроль и отрицательный контроль.
5. Инкубируйте в течение ночи при комнатной температуре (10-16 часов).
6. Промойте 4 раза двумя мл буфера для промывки и разведения, каждый раз в течение 5 минут.
7. Добавьте по 2 мл свежеприготовленного раствора конъюгата.
8. Инкубируйте 1 час при комнатной температуре.
9. Промойте 4 раза двумя мл буфера для промывки и разведения, каждый раз в течение 5 минут.
10. Добавьте 1,5 мл раствора субстрата.
11. Инкубируйте 5-15 минут при комнатной температуре.
12. Ополосните стрипы деионизированной водой.
13. Высушите между листами фильтровальной бумаги.
14. Проанализируйте результаты.

11. АНАЛИЗ

Действие теста проверяют с помощью низких положительных контролей, которые включают в каждую процедуру теста, с помощью отрицательного контроля и с помощью инкубационной контрольной полосы, которая присутствует на каждом стрипе.

Инкубационную контрольную полосу можно обнаружить под нумерацией. В нее включен протеин А, который связывает глобулины и который должен, таким образом, быть виден на каждом стрипе, если тест был проведен правильно.

Если тест проведен правильно, низкий положительный IgG-контроль дает слабоокрашенную, но четко видимую полосу VP-N; VP-C дает более слабую и относительно широкую и диффузную полосу. VP-1S-полоса очень слабо или совсем не реагирует с этой сывороткой.

Низкий положительный IgM-контроль дает относительно четкую VP-N-полосу и очень слабо видимую VP-C-полосу. Отрицательный контроль кроме инкубационной контрольной полосы не должен давать никаких других полос.

Для лучшего документирования можно прикрепить стрипы с помощью клейкой ленты к прилагаемым бланкам и описать обнаруженные полосы. В протокол нужно внести дату и номер лота набора.

Для анализа образца пациента инкубационную контрольную полосу стрипа необходимо совместить с контрольной полосой эталона. С помощью описания полос на эталоне можно идентифицировать видимые полосы стрипа с образцом пациента. Интенсивность идентифицированных полос сравнивают с интенсивностью полос на стрипах с соответствующими низкими положительными контролями (IgM и IgG). С помощью этого сравнения, а также с помощью таблицы 4, определяют интенсивность отдельных полос и записывают результат оценки в протокол.

Таблица 4. Анализ интенсивности полос.

Интенсивность полос	Оценка
Не видна	-
Очень слабая интенсивность	+/-
Слабая интенсивность (по сравнению с низким положительным контролем)	+
Видимая интенсивность	++
Четко выраженная интенсивность	+++

11.1. Анализ определения IgM-антител

Для положительных/отрицательных результатов определения IgM-антител не принимается во внимание возможность появления реактивности антител по отношению к NS-1 протеину.

Таблица 5. Анализ определения IgM-антител.

IgM положительный результат	IgM неопределенный результат	IgM отрицательный результат
VP-N по крайней мере + и VP-C по крайней мере +/-	VP-N по крайней мере + или VP-C по крайней мере + или VP-N и VP-C +/-	
Другие полосы могут, но не должны появиться	Другие полосы могут, но не должны появиться	Нет реакции или другая группа полос

11.2. Анализ определения IgG-антител

Для положительных/отрицательных результатов определения IgG-антител не принимается во внимание возможность появления реактивности антител по отношению к NS-1 протеину.

Таблица 6. Анализ определения IgG-антител.

IgG положительный результат	IgG неопределенный результат	IgG отрицательный результат
VP-N по крайней мере +	VP-N по крайней мере + или VP-N и VP-C +/-	
Другие полосы могут, но не должны появиться	Другие полосы могут, но не должны появиться	Нет реакции или другая группа полос, в особенности, отдельные слабые реакции на VP-1S

11.3. Анализ реактивности по отношению к NS-1

На сегодняшний день известно, что антитела к этому белку появляются только при устойчивых инфекциях парвовирусом B19. Поэтому при оценке положительных результатов вестерн-блота реактивность по отношению к NS-1 во внимание не принимается. Пока идентифицированы только IgG антитела к NS-1. Самое раннее, они обнаруживались только через 6-8 недель после инфекции.

Появляющаяся реактивность по отношению к NS-1 может, таким образом, обсуждаться как указание на возможную стойкую инфекцию.

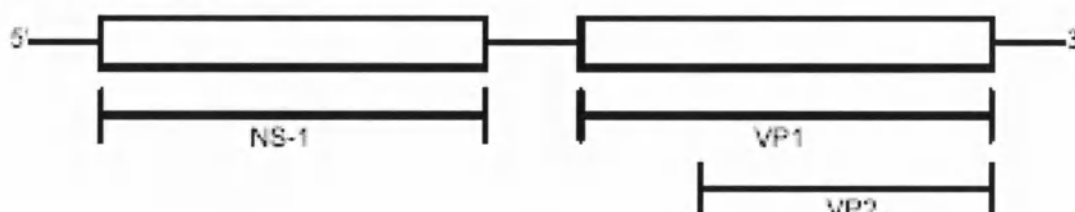
12. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

12.1. Диагностическое значение рекомбинантных антигенов B19

Геном парвовируса B19 размером приблизительно в 5,4 тыс. пар оснований содержит генетическую информацию о двух структурных белках и одном неструктурном протеине (см. рис. 1). Капсид, окружающий ДНК, формируется двумя структурными белками VP1 и VP2. Оба структурных белка размером 84 кДа и 58 кДа кодируются в общей рамке считывания генома вируса, в соответствии с этим у более короткого белка VP2 начало транскрипции находится в нижнем участке рамки считывания белка VP1. Это означает, что оба белка имеют идентичную структуру, за исключением добавочной N-концевой последовательности VP1, которая имеет размеры 26 кДа. Неструктурный белок (NS-1) размером приблизительно в 77 кДа необходим для репликации и размножения вируса.

В тесте RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG/IgM структурный белок VP1 разделен на два сегмента, которые позволяют точно интерпретировать появляющийся иммунный ответ. После первоначальной инфекции в начале иммунного ответа формируются IgM антитела и также обычно IgG антитела к линейным эпитопам структурных белков VP1 и VP2. Антитела к линейным эпитопам N-конца структурных белков (VP-N в тесте RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG/IgM) обычно остаются на всю жизнь. Антитела, сформированные к линейным эпитопам на C-концевой части структурных белков (VP-C) существенно образом пропадают в течение 6-12 месяцев или исчезают совсем. Сильная реактивность по отношению к VP-C, таким образом, указывает на недавнюю или только что обнаруженную инфекцию.

Структура генома парвовируса.



Антигены, используемые в RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG/IgM.

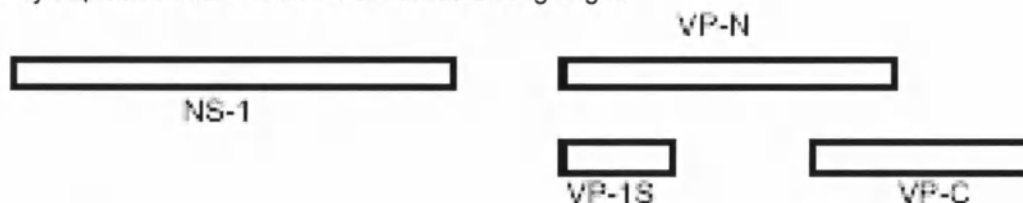


Рис. 1. Структура генома парвовируса и рекомбинантных антигенов.

12.2. Интерпретация

Отрицательный результат иммуноблота не может исключить инфекцию парвовирусом B19. На ранней стадии в начале инфекции иммунный ответ может быть таким слабым, что серологическое определение будет невозможно. В этом случае, если сохраняется клиническая подозрение или результат иммуноблота неопределенный, через неделю следует проанализировать повторный образец сыворотки. Если не видно различий в сероконверсии, инфекция парвовирусом B19 маловероятна.

Если результат определения IgM положительный или слабо положительный, необходимо также принимать во внимание результат определения IgG. Если инфекция недавняя, то обычно в дополнение к полосам VP-N и VP-1S также очень сильно реагирует полоса VP-C. Если IgG-реактивность по отношению к VP-C отсутствует, недавняя инфекция маловероятна. Слабая IgM-реактивность может быть связана с реактивацией IgM-антител, сохранившихся от прежней инфекции, например, после инфекции вирусом Эпштейна-Барра или из-за неспецифически связывающихся антител.

Различная реактивность по отношению к VP-C с отрицательным результатом определения IgM-антител указывает на недавнюю инфекцию (6-12 месяцев).

Реактивность по отношению к NS-1 может рассматриваться только при решении специальных вопросов. Например, если необходимо выяснить причину непостоянной артропатии, обнаружение антител против этого белка может указывать на стойкую инфекцию парвовирусом B19. Так как эти антитела можно обнаружить только через 6-8 недель после инфекции, их присутствие указывает на стойкое заболевание и позволяет сделать вывод о неизвестном начале инфекции. Так как антитела к NS-1 могут присутствовать даже в случае, если инфекция прошла (в опыте 24,7% сывороток показывали частичную очень слабую реактивность по отношению к NS-1), эта реакция не является существенным доказательством устойчивой инфекции. Таким образом, в случае клинического подозрения, для подтверждения диагноза необходимо принимать во внимание результаты определения антигенов парвовируса или ДНК. Однако необходимо

учитывать, что при персистирующей инфекции ПЦР-определение иногда может не давать положительного результата. При оценке реактивности NS-1 необходимо учитывать, что в соответствии с индивидуальными иммунными ответами антитела к NS-1 также могут появляться с задержкой.

12.3. Типичные реакционные профили в тесте RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG/IgM

Согласно современным оценкам следующие варианты IgM/IgG-реактивности могут служить указанием на специфическое состояние инфекции парвовируса B19. Необходимо отметить, что эта таблица включает типичные варианты реактивности, но также возможны и отклонения.

Таблица 7. Статус парвовируса B19 и типичные примеры реактивности антител.

IgM	IgG	Возможный статус инфекции парвовируса B19
Отрицательный результат	Отчетливая реактивность на VP-N, возможно также на VP-1S; очень слабая или отрицательная реактивность на VP-C	Инфекция имела место в прошлом (годы)
Отрицательный, неопределенный или слабо положительный результат	Сильная реактивность на VP-N и VP-C, возможно также на VP-1S	Состояние после инфекции (месяцы)
Отчетливая реактивность на VP-N и VP-C	Сильная реактивность на VP-N и VP-C, возможно также на VP-1S	Состояние после инфекции (недели)
Отчетливая реактивность на VP-N и VP-C	Отрицательная, неопределенная или слабо положительная реактивность	Состояние недавней инфекции
Слабая или неопределенная реактивность VP-N и/или VP-C (возможно VP-1S)	Слабая реактивность на VP-N и VP-C	Непонятное состояние, возможно вызванное неспецифической реактивацией; тест необходимо повторить через некоторое время

Внимание!

В таблице, приведенной выше, при выяснении причин устойчивой инфекции парвовирусом B19, а также реактивных артропатий, хронических анемий или других симптомов с подозрением на устойчивую инфекцию парвовирусом B19 не учитывается анализ титров антител к NS-1, так как, в зависимости от продолжительности заболевания, клинической и иммунологической компетентности, возможны различные варианты. Более того, соответственный титр можно оценить только в совокупности с клиническими симптомами. Диагноз может быть гарантированным только при выявлении антигена или генома вируса.

13. КЛИНИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

13.1. Сравнение с коммерческим ИФА-тестом на парвовирус B19

Таблица 8. Результаты определения IgG антител.

IgG ИФА	RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgG			
	отрицательный (%)	положительный (%)	неопределенный (%)	всего (%)
отрицательный (%)	7 (7,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (7,8)
положительный (%)	4 (4,4)	0 (0,0)	6 (6,7)	10 (11,1)
неопределенный (%)	5 (5,6)	1 (1,1)	67 (74,4)	73 (81,1)
всего (%)	16 (17,8)	1 (1,1)	73 (81,1)	90 (100,0)

Таблица 9. Результаты определения IgM антител.

IgM ИФА	RIDA® BLOT Parvovirus B19 IgM			
	отрицательный (%)	положительный (%)	неопределенный (%)	всего (%)
отрицательный (%)	34 (37,8)	2 (2,2)	0 (0,0)	73 (81,1)
положительный (%)	5 (5,6)	1 (1,1)	0 (0,0)	10 (11,1)
неопределенный (%)	9 (10,0)	4 (4,4)	35 (38,9)	7 (7,8)
всего (%)	48 (53,3)	7 (7,8)	35 (38,9)	90 (100,0)

13.2. Время появления антител к NS-1

Для выяснения этого вопроса во время беременности были проанализированы 82 образца сыворотки крови женщин, инфицированных парвовирусом B19. Образцы были отобраны между двумя неделями и девятью месяцами после инфицирования. Во всех образцах были обнаружены типичные реакции (сильная реактивность IgG на VP-N и VP-C, переходящий положительный результат на IgM). Во всех образцах не обнаружены IgM-антитела к NS-1. Титр IgG антител к NS-1 был выявлен не раньше чем через 6 недель после инфицирования (32% исследованных образцов).

13.3. Частота титров IgG к NS-1 в нормальной популяции

Исследовали 197 образцов крови доноров и 300 образцов крови женщин (разделенных на возрастные группы) на титр IgG антител к NS-1.

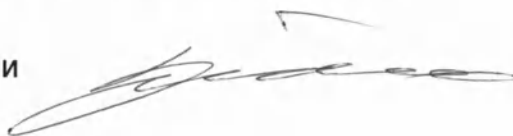
Таблица 10. Частота IgG-титров.

	Доноры крови	20-29 лет	30-39 лет	50-59 лет	Всего
Количество сывороток	197	99	101	100	497
Положительные на B19	75,1%	64,6%	62,3%	69,0%	69,2%
Положительные на NS-1*	27,7%	37,7%	30,1%	2,9%	24,7%

*В анализе также присутствовала очень слабая реактивность.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 5 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения кампилобактерий
(RIDASCREEN® Campylobacter)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Campylobacter

Иммуноферментный тест для диагностического обнаружения кампилобактерий *in vitro*.

Набор на 96 определений**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор предназначен для качественного определения антигенов *C. jejuni* и *C. coli* в образцах кала.

2. ВВЕДЕНИЕ

Наряду с сальмонеллезом кампилобактериоз в настоящее время является одной из главных причин передающейся через пищу диареи у людей. Значительно участвовавшие случаи энтерита, вызванного *Campylobacter*, связаны со способностью бактерий распространяться с помощью различных видов животных, таких как дичь, сельскохозяйственные и домашние животные (птицы и млекопитающие). Так как *Campylobacter* является симбионтом в кишечном тракте домашней птицы, появление бактерий в пищевой цепи человека происходит в основном от этих животных. Однако, другие продукты, такие как молоко, мясной фарш и напитки, также могут стать источниками этого патогена. *Campylobacter* выделяется в окружающую среду в больших количествах из множества организмов-хозяев, в которых бактерии интенсивно делятся, и, в конце концов, люди инфицируются через загрязненную пищу. Непосредственный контакт с домашними животными, страдающими от кампилобактериоза, и фекально-оральный путь, в основном у маленьких детей, также являются возможными способами распространения энтерита, вызываемого *Campylobacter*. Инфекционная доза 500 организмов бактерий относительно низка. Из приблизительно 15 известных видов *Campylobacter*, *C. jejuni* и *C. coli* являются главными источниками возникновения энтерита. После инкубационного периода, составляющего от 2 до 10 дней, инфицированный человек без лечения может оставаться распространителем инфекции до 4 недель, пока патоген выделяется в кал. У людей с ослабленным иммунитетом выделение патогена может быть постоянным. Хотя многие инфекции могут протекать бессимптомно, если болезнь проявилась, после продромального периода, который длится 12-24 ч, появятся такие симптомы, как лихорадка, головная боль, боль в мышцах, суставах и усталость, а также типичные симптомы энтерита – диарея, боли и спазмы в животе. Кал при диарее от мягкого до очень водянистого и иногда содержит кровь. В редких случаях поздними симптомами заболевания являются артрит и синдром Гийена-Барре. Терапия обычно включает лечение симптомов методом замещения жидкости и электролитов. Лечение антибиотиками применяется только в тяжелых случаях. Для успешного культивирования чувствительного патогена необходимо, чтобы образцы кала были свежесобранными и транспортировались в охлажденном виде в минимально короткий срок. Современные методы антигенного провокационного тестирования, такие как RIDASCREEN® Campylobacter, специфичны к антигенам *Campylobacter* и обнаруживают патоген в образцах кала, даже если бактерии более не могут расти в культуре.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Иммуноферментный тест RIDASCREEN® Campylobacter основан на принципах сэндвич-анализа с использованием специфических антител. На поверхность лунок микропланшета адсорбируют антитела, специфичные к антигенам кампилобактерий *C. jejuni* и *C. coli*. В лунки вносят анализируемые суспензии образцов кала и контроли и инкубируют при комнатной температуре (20-25 °C). После промывки в лунки добавляют антитела к антигенам *C. jejuni* и *C. coli*, конъюгированные с пероксидазой и инкубируют при комнатной температуре (20-25 °C). Если в образцах присутствуют антигены кампилобактерий, образуется сэндвич-комплекс, в котором антигены находятся между твердой фазой лунок и антителами, конъюгированными с ферментом. Не связавшийся пероксидазный конъюгат удаляют на следующей стадии

промывки. Если образец положительный, то после внесения в лунки раствора субстрата конъюгированный фермент превращает бесцветный субстрат в окрашенный в синий цвет продукт. Добавление стоп-реагента меняет окраску с синего цвета на желтый. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антигенов кампилобактерий, присутствующих в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет в рамке-держателе, состоящий из двенадцати отделяемых 8-луночных стрипов, с адсорбированными антителами, специфичными к антигенам кампилобактерий <i>C. jejuni</i> и <i>C. Coli</i> ; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 лунок
Diluent	Буфер для разведения образцов: содержит забуференный белковый раствор NaCl, 0,1%-ный Kathon; окрашен в голубой цвет; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash	Промывочный буфер: 10x концентрат; содержит забуференный фосфатом раствор NaCl, 0,1%-ный тимерозал (мертиолят)	1 x 100 мл
Control+	Контрольный раствор положительный: инаktivированные бактерии <i>Campylobacter jejuni</i> ; содержит 0,1%-ный Kathon; готов к использованию	1 x 1,8 мл
Conjugate	Конъюгат фермента: антитела к кампилобактериям, конъюгированные с пероксидазой хрена; содержит стабилизирующий белковый раствор, 0,1%-ный Kathon; готов к использованию	1 x 10 мл
Substrate	Раствор субстрата: содержит пероксид мочевины / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 10 мл
Stop	Стоп-реагент: 1N серная кислота; готов к использованию	1 x 6 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать только до истечения срока их годности, указанного на этикетках флаконов. Разведенный промывочный буфер сохраняется в течение 4 недель при хранении при 2-8 °C. Необходимо исключить микробную контаминацию. Гарантийные обязательства при несоответствии качества набора не удовлетворяются после истечения срока его годности. Пакет из фольги необходимо открывать с помощью ножниц, не повреждая застёжку. Верните неиспользованные стрипы в пакет из фольги, запечатайте пакет и храните его при 2-8 °C.

Бесцветный раствор субстрата необходимо хранить в защищенном от света месте, чтобы избежать порчи или появления окраски в результате самоокисления. Если субстрат приобрел синее окрашивание, этот реагент использовать нельзя.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизированная вода.

6.2. Оборудование

- Пробирки для анализа
- Одноразовые трансфер-пипетки (кат. № Z0001)
- Вортекс (дополнительно, см. раздел 9.3)
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 50 - 100 мкл и 1 мл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Таймер
- Прибор для промывания микропланшетов или многоканальные пипетки (300 мкл)
- Планшетный фотометр (ридер ELISA) (450 нм, при необходимости дополнительная длина волны сравнения ≥ 600 нм)
- Фильтровальная (или любая другая впитывающая бумага, например, бумажные полотенца)
- Контейнер для отходов с 0,5% раствором гипохлорита

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Только для диагностики *in vitro*.

Этот тест должен проводить только хорошо обученный лабораторный персонал. Необходимо строго придерживаться правил работы в медицинских лабораториях и точно следовать инструкции для выполнения тестирования.

Положительный контроль содержит инаktivированные антигены кампилобактерий. Несмотря на это, следует придерживаться необходимых мер предосторожности и в соответствии с действующими

официальными инструкциями и правилами обращаться с положительным контролем, а также с образцами пациентов как с веществами, несущими потенциальную инфекционную опасность.

Не пипетируйте образцы и реагенты с помощью рта, не допускайте их попадания на кожу и слизистые. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми защитными перчатками. После окончания тестирования тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где работали с образцами пациентов и компонентами набора.

Положительный контроль, буфер для разведения образцов и конъюгат содержат 0,1%-ный Kathlon в качестве консерванта. Это соединение не должно попадать на кожу и слизистые.

Промывочный буфер содержит 0,1%-ный тимерозал (мертиолят) в качестве консерванта. Избегайте контактов с кожей и слизистыми.

Перекись мочевины может вызвать ожоги. Обращайтесь с реагентом с осторожностью.

Стоп-реагент содержит 1N серную кислоту. Избегайте контактов с кожей и одеждой. При попадании на кожу промойте пораженный участок большим количеством воды.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавировать при 121 °C не менее 1 часа.

ВНИМАНИЕ: Чтобы избежать образования ядовитых газов, перед добавлением раствора гипохлорита все остатки жидкости, содержащие стоп-реагент, необходимо нейтрализовать.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

До анализа материал для тестирования необходимо хранить при 2-8°C. Если образцы не планируют тестировать в течение 3 дней, их рекомендуется хранить в замороженном виде при -20°C и ниже. Следует исключить многократное повторное оттаивание и замораживание образцов. Образцы кала или ректальные тампоны не следует перевозить в контейнерах, которые содержат среды, консерванты, сыворотку крови животных, ионы металлов, окисляющие агенты или детергенты, так как они могут мешать определению в тесте RIDASCREEN® Campylobacter. При использовании ректальных тампонов убедитесь в том, что собрано достаточное для выполнения теста количество кала (приблизительно 100 мг). При исследовании пациентов, находившихся в контакте, образцы кала необходимо брать и у лиц, у которых отсутствуют признаки заболевания, чтобы идентифицировать возможных бессимптомных носителей.

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Предварительные комментарии

Перед использованием прогрейте все реагенты и микропланшеты **Plate** при комнатной температуре (20-25 °C). Стрипы с лунками не следует вынимать из пакета до тех пор, пока они не прогреются до комнатной температуры. Перед использованием все реагенты необходимо тщательно перемешать. После использования стрипы (в закрытом пакете) и все реагенты следует хранить при 2-8 °C. Использованные стрипы нельзя анализировать повторно. Нельзя использовать реагенты и стрипы, если их упаковка была повреждена или если флаконы подтекали. Чтобы не допустить микробного загрязнения, нужно избегать непосредственного контакта образцов с компонентами набора. Тест нельзя проводить в условиях попадания прямого солнечного света. Чтобы не допустить испарения в лунках, планшет рекомендуется закрывать или заклеивать.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Одну часть концентрированного промывочного буфера **Wash** разводят девятью частями дистиллированной воды (**разведение 1:10**). Кристаллы в концентрате буфера необходимо предварительно растворить на водяной бане при 37 °C.

9.3. Приготовление образцов

Поместите в промаркированные пробирки по 1 мл буфера для разведения образцов **Diluent**. Наберите жидкий кал в одноразовую трансфер-пипетку (кат. № Z0001) до второго утолщения (приблизительно 100 мкл) и суспендируйте это количество в буфере для разведения образцов (**разведение 1:11**). Если кал твердый, отберите эквивалентное количество (около 50-100 мг) с помощью шпателя или одноразовой инокуляционной петли и суспендируйте образец в растворе. Гомогенизируйте суспензию кала, набирая и выпуская ее из пипетки или аккуратно перемешивая на Вортексе. После небольшого времени оседания прозрачный супернатант суспензии кала можно непосредственно использовать для тестирования. Если процедуру тестирования проводят на приборе для ИФА, супернатант **не должен** содержать частиц. В этом случае рекомендуется центрифугировать образец при 5000 об/мин (приблизительно 2300-2500 g) в течение 5 минут.

9.4. Первая инкубация

Поместите в держатель необходимое количество лунок. В отдельные лунки внесите по 2 капли (100 мкл) положительного контроля **Control +**, буфера для разведения образцов **Diluent** (=отрицательный контроль) или суспензии кала. Затем инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) в течение 60 мин.

9.5. Промывка

Чтобы получить правильные результаты, необходимо тщательно проводить процедуру промывки в полном соответствии с настоящей инструкцией. Вещества, инкубируемые в лунках, необходимо удалять в контейнер для отходов с дезинфицирующим раствором гипохлорита. После этого постучите перевернутым микропланшетом по фильтровальной бумаге, чтобы полностью удалить остатки жидкости из лунок. После этого промойте планшет 5 раз, используя каждый раз по 300 мкл промывочного буфера [Wash] на лунку. Чтобы быть уверенным в полном удалении остатков жидкости, после каждой промывки энергично постучите перевернутым микропланшетом по фильтровальной бумаге, которая должна быть сухой и не использованной ранее.

Если вы используете прибор для автоматического промывания микропланшетов, убедитесь в том, что этот прибор правильно отрегулирован для используемого типа микропланшетов. Кроме того, если суспензия кала не была освобождена от взвешенных частиц, до первой промывки ее необходимо отцентрифугировать, чтобы не допустить засорения промывочных игл. Во время всех промывок убедитесь в том, что жидкость из лунок была удалена полностью. После финального промывания необходимо энергично постучать перевернутым микропланшетом по чистой фильтровальной бумаге или бумажному полотенцу, чтобы полностью удалить все остатки жидкости. Чтобы получить оптимальные результаты, рекомендуется промывать лунки в режиме переполнения, используя на каждой стадии по крайней мере 600 мкл промывочного буфера на лунку. Количество промывок можно увеличить до 6 и более. Иногда это улучшает результаты промывки.

9.6. Вторая инкубация

Добавьте в каждую лунку по 2 капли (100 мкл) раствора конъюгата [Conjugate] и инкубируйте микропланшет при комнатной температуре (20-25 °C) в течение 30 минут.

9.7. Промывка

Промывка – см. раздел 9.5.

9.8. Третья инкубация

Добавьте в каждую лунку по 2 капли (100 мкл) раствора субстрата [Substrate]. Затем инкубируйте микропланшет при комнатной температуре (20-25 °C) в течение 15 минут в темноте. После инкубации реакцию останавливают добавлением в каждую лунку 1 капли (50 мкл) стоп-реагента [Stop]. После тщательного перемешивания (мягкое постукивание по краю микропланшета) измерьте поглощение при 450 нм, по желанию используя длину волны сравнения ≥ 600 нм. В этом случае обнулите прибор без микропланшета против воздуха.

Примечание: Сильно положительные образцы пациентов могут давать образование темных осадков субстрата.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для контроля качества теста в каждое измерение необходимо включить положительный и отрицательный контроли, чтобы убедиться в стабильности реагентов и правильном выполнении анализа. Измерение проведено правильно, если оптическая плотность (OD) отрицательного контроля при 450 нм ниже 0,2, а оптическая плотность положительного контроля при 450 нм выше 0,8. Если поглощение отрицательного контроля выше 0,2, это может указывать на недостаточно полную промывку. Если величины OD отличаются от тех, которые должны быть, если раствор субстрата мутный или окрашен в голубой цвет, это может указывать на то, что срок годности реагентов истек. Если полученные результаты не укладываются в ожидаемые значения, перед тем, как повторить тестирование, проверьте следующие позиции:

- Срок годности реагентов
- Функциональность используемого оборудования (например, проведите калибровку)
- Точность выполнения анализа
- Визуальный контроль признаков загрязнения, порчи или утечки компонентов набора; раствор субстрата нельзя использовать, если он имеет синее окрашивание.

Если результаты, полученные для контролей, отличаются от ожидаемых даже после повторного тестирования, свяжитесь с фирмой-производителем или со своим поставщиком.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Расчеты порогового уровня (уровня отсечения, cut-off)

Уровень отсечения определяют прибавлением 0,15 единиц поглощения к измеренному значению отрицательного контроля.

$$\text{Уровень отсечения} = \text{оптическая плотность отрицательного контроля} + 0,15$$

11.2. Результаты тестирования

Образцы считают **положительными**, если их оптическая плотность более чем на 10% выше порогового уровня отсечения.

Образцы, у которых оптическая плотность в пределах $\pm 10\%$ от порогового уровня не должны рассматриваться как точно положительные или точно отрицательные. Их следует относить к **промежуточным**. Такие образцы следует протестировать снова. Если вновь проведенное тестирование свежего образца снова дает промежуточные результаты, образец следует рассматривать как отрицательный.

Образцы считают **отрицательными**, если оптическая плотность ниже на 10% порогового уровня отсечения.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Campylobacter определяет антигены кампилобактерий *C. jejuni* и *C. coli* в образцах кала. В большинстве случаев также выявляются и образцы, содержащие *C. lari*. Этот тест нельзя использовать для выявления связи между значениями оптической плотности и появлением клинических симптомов заболевания. **Результаты измерения необходимо интерпретировать в совокупности с клиническим диагнозом.**

Положительные результаты не исключают присутствия других инфекционных патогенов.

Отрицательные результаты не исключают наличия инфекции *C. jejuni* и *C. coli*. Это происходит из-за пульсирующего выделения патогена или из-за того, что в исследованном образце содержалось слишком мало антигенов. Если есть причины подозревать у пациента наличие инфекции *C. jejuni* и *C. coli*, необходимо дальнейшее исследование образцов кала.

Промежуточные результаты могут быть вызваны неравномерным распределением антигенов в образце. В этом случае необходимо исследовать другую суспензию того же самого образца или получить другой образец для тестирования.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Качество определения

В сравнительном исследовании с использованием метода культивирования патогена, представляющего собой «золотой стандарт», тест RIDASCREEN® Campylobacter продемонстрировал превосходную достоверность с чувствительностью 100% и специфичностью 99,6%. Это исследование было проведено в лаборатории, сертифицированной специалистами Управления по контролю за продуктами и лекарствами (США), в которую были отправлены 259 свежих, стандартно собранных образцов кала. Результаты сравнительного исследования методов RIDASCREEN® Campylobacter и культивирования бактерий представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты тестирования с помощью набора RIDASCREEN® Campylobacter и с помощью метода культивирования бактерий.

RIDASCREEN®		Культивирование бактерий	
		Положительный результат	Отрицательный результат
	Положительный результат	14	1
	Отрицательный результат	0	244

Чувствительность: 100,0%

Специфичность: 99,6%

Предсказанные положительные значения: 93,3%

Предсказанные отрицательные значения: 100,0%

13.2. Перекрестная реактивность

С помощью набора RIDASCREEN® Campylobacter были протестированы различные патогенные организмы кишечника. Результаты тестирования были отрицательными. Исследование проводили в суспензиях бактерий, которые культивировали в течение ночи в ВНИ-среде, содержащей от 10^6 до 10^8 бактерий в мл. Тест проводили, анализируя образцы в параллельных пробах. Поглощение измеряли при 450 нм. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Перекрестная реактивность с патогенными бактериями.

Протестированные бактерии	Источник	Неразведенная культура		Культура в образцах 1:11	
		OD	результат	OD	результат
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	DSM 2403	0,101	отриц.	0,058	отриц.
<i>Aeromonas hydrophilia anaerogenes</i>	DSM 30020	0,083	отриц.	0,046	отриц.
<i>Aeromonas hydrophilia hydrophilia</i>	DSM 30016	0,064	отриц.	0,046	отриц.
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30047	0,057	отриц.	0,045	отриц.
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	0,058	отриц.	0,044	отриц.
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	0,168	отриц.	0,045	отриц.
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	0,124	отриц.	0,047	отриц.
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477	0,11	отриц.	0,057	отриц.
<i>Escherichia coli</i>	Изолированная	0,111	отриц.	0,061	отриц.
<i>Escherichia coli</i>	Изолированная	0,146	отриц.	0,047	отриц.
<i>Escherichia coli</i>	Изолированная	0,114	отриц.	0,043	отриц.
<i>Escherichia hermanni</i>	DSM 4560	0,053	отриц.	0,045	отриц.
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 20481	0,065	отриц.	0,043	отриц.
<i>Listeria innocua</i>	SLCC 5639	0,046	отриц.	0,045	отриц.
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788	0,045	отриц.	0,046	отриц.
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479	0,126	отриц.	0,087	отриц.
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 30119	0,012	отриц.	0,073	отриц.
<i>Providencia stuartii</i>	DSM 6676	0,086	отриц.	0,042	отриц.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 939	0,255	полож.	0,053	отриц.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 4358	0,083	отриц.	0,046	отриц.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50124	0,057	отриц.	0,046	отриц.
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291	0,182	отриц.	0,144	отриц.
<i>Salmonella agona</i>	Изолированная	0,066	отриц.	0,046	отриц.
<i>Salmonella choleraesuis</i>	DSM 4224	0,069	отриц.	0,055	отриц.
<i>Salmonella infantis</i>	Изолированная	0,202	полож.	0,055	отриц.
<i>Salmonella ohio</i>	Изолированная	0,407	полож.	0,061	отриц.
<i>Salmonella typhimurium</i>	Изолированная	0,103	отриц.	0,041	отриц.
<i>Serratia proteamaculans</i>	DSM 4487	0,041	отриц.	0,038	отриц.
<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782	0,062	отриц.	0,039	отриц.
<i>Shigella sonnei</i>	DSM 5570	0,068	отриц.	0,04	отриц.
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20372	0,13	отриц.	0,135	отриц.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Изолированная	0,041	отриц.	0,047	отриц.
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Изолированная	0,041	отриц.	0,063	отриц.
<i>Streptococcus uberis</i>	Изолированная	0,04	отриц.	0,039	отриц.
<i>Escherichia coli</i> (0157:H7-)	Изолированная	0,131	отриц.	0,039	отриц.
<i>Escherichia coli</i> (0116:H21)	Изолированная	0,066	отриц.	0,056	отриц.
<i>Escherichia coli</i> (0111:H-)	Изолированная	0,052	отриц.	0,038	отриц.
<i>Escherichia coli</i> (022:H8)	Изолированная	0,061	отриц.	0,05	отриц.
<i>Escherichia coli</i> (026:H11)	Изолированная	0,055	отриц.	0,041	отриц.
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	0,044	отриц.	0,044	отриц.
<i>Salmonella enteritidis</i>	DSM 9898	0,12	отриц.	0,061	отриц.
<i>Morganella morganii</i>	DSM 6675	0,058	отриц.	0,043	отриц.
Положительный контроль		2,555		2,568	
Отрицательный контроль		0,046		0,043	
Уровень отсека		0,196		0,193	

13.3. Воспроизводимость измерения

Были определены различия результатов, полученных внутри одного измерения положительного и отрицательного контролей из 24 партий набора, а также в средне- (mpg) и в низко- (lpr) титруемых образцах кала, содержащих *C. jejuni* и *C. coli*. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Воспроизводимость данных внутри одного измерения.

Образцы	OD _{450 нм}	CV (%)
Отрицательный контроль	0,042	1,8
Положительный контроль	2,701	4
C. jejuni mpr	1,039	8,2
C. jejuni lpr	0,494	10,5
C. coli mpr	1,257	4,7
C. coli lpr	0,734	4,6

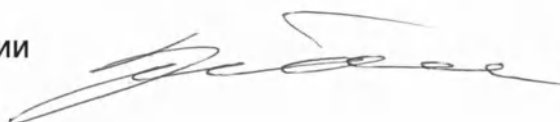
Расхождения результатов в различных измерениях были определены в опытах, проводимых один за другим в течение 5 дней, с использованием реагентов, описанных выше, из 6 различных партий набора. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4. Воспроизводимость данных между различными измерениями.

Дата	День 1		День 2		День 3		День 4		День 5	
Образцы	OD _{450 нм}	CV (%)	OD _{450 нм}	CV (%)	OD _{450 нм}	CV (%)	OD _{450 нм}	CV (%)	OD _{450 нм}	CV (%)
Отрицат. контроль	0,043	6,5	0,041	7,2	0,040	4,7	0,042	5,7	0,040	7,7
Положит. контроль	2,646	3,4	2,337	3,2	2,515	3,1	2,474	3,4	2,508	3,9
C. jejuni mpr	1,081	6,1	0,891	4,5	0,948	5,4	0,995	5,3	0,981	5,0
C. jejuni lpr	0,589	3,2	0,371	8,1	0,466	5,9	0,453	7,3	0,424	8,4
C. coli mpr	1,182	3,9	0,886	4,8	1,002	9,7	0,961	5,8	0,965	7,4
C. coli lpr	0,671	5,1	0,515	6,0	0,568	7,1	0,544	7,3	0,510	8,4

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции

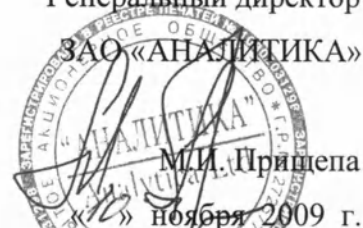


К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»
М.И. Прищепа
ноября 2009 г.**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

**Набор реагентов для определения токсина А и В клостридий диффициле
(RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)**

RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B

Иммуноферментный тест для определения токсинов А и В *Clostridium difficile* в образцах кала человека

Набор на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного выявления *in vitro* токсинов А и В клостридий (*Clostridium difficile*) в образцах кала человека.

2. ВВЕДЕНИЕ

Диарея является обычным побочным эффектом при лечении антибиотиками. В частности, после введения в медицинскую практику антибиотика клиндамицина в начале 70-х годов, стало наблюдаться больше тяжелых случаев заболевания (ассоциированный с антибиотиками колит, или ААК), приводящих к выраженной форме псевдомембранозного колита (ПМК). *Clostridium difficile* является основной причиной псевдомембранозного колита и одной из нескольких причин возникновения ассоциированной с антибиотиками диареи (ААД) и ААК. Токсины А и В, секретируемые токсигенными штаммами *C. difficile*, этиологически важны для клинических проявлений заболевания. Эти токсины являются высокомолекулярными белками с молекулярным весом более 200 кД. Они токсины различаются по биологическим и иммунологическим свойствам. Токсин А действует как энтеротоксин, токсин В – как цитотоксин; оба токсина могут действовать синергически *in vivo*. Так как не все штаммы *C. difficile* продуцируют токсины, и в тоже время примерно у 2% здоровых взрослых людей и почти половины всех детей в возрасте до 2 лет, кишечник может быть заселен *C. difficile*, определение токсинов А и В в образцах кала пациентов с диареей важнее, чем выделение культуры бактерий.

В иммуноферментном наборе реагентов RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B используются моноклональные антитела для одновременного и специфического обнаружения в образцах кала пациентов токсина А и токсина В. Достоверный результат получают за 2,5 часа, что позволяет раньше начать эффективное лечение.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B основан на методе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Данный набор предназначен для качественного определения токсинов А и В, продуцируемых *C. difficile*. В лунках стрипов микротитровального планшета адсорбированы моноклональные антитела к токсинам А и В. На первой стадии разведенные образцы кала вносят в лунки планшета и сразу же после этого добавляют биотинилированные антитела к токсинам А и В (конъюгат биотина). Токсины А и В, если они присутствуют в образце, образуют в растворе комплексы с биотинилированными антителами. Эти комплексы связываются, в свою очередь, с иммобилизованными на твердой фазе моноклональными антителами. Избыток несвязавшегося конъюгата биотина удаляют промывкой. Затем, на второй стадии, добавляют стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (конъюгат стрептавидаина), который связывается на стенках лунок с образованным ранее иммунокомплексом (моноклональные антитела/токсин/конъюгат биотина). Связавшийся конъюгат стрептавидаина обнаруживают на последней стадии, после удаления избытка конъюгата промывкой и добавления в лунки субстрата/хромогена. Пероксидаза превращает бесцветную форму субстрата/хромогена в продукт, окрашенный в синий цвет, который переходит в желтый после остановки ферментативной реакции стоп-реагентом. Интенсивность окрашивания раствора в лунках, которая является мерой концентрации токсина в исследуемом образце,

измеряется на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм (референтная длина волны ≥ 600 нм).

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет 96-луночный: в рамке-держателе, разделяемый на двенадцать 8-луночных стрипов, покрытых моноклональными антителами мыши к токсинам А и В; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 лунок
Diluent	Раствор для разведения образцов: забуференный белковый раствор NaCl; содержит 0,1% NaN ₃ ; красного цвета; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash	Промывочный буфер: 10x концентрат, фосфатный буферный раствор с NaCl; содержит 0,1% тимеросал (мертиолят)	1 x 100 мл
Control +	Положительный контроль: частично денатурированный токсин; готов к использованию	1 x 1,8 мл
Conjugate	Конъюгат: антитела к токсинам А и В, конъюгированные с пероксидазой хрена; в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃ ; готов к использованию	1 x 6 мл
Substrate	Субстратный раствор: пероксид мочевины / ТМБ; готов к использованию	1 x 10 мл
Stop	Стоп-реагент: 1N раствор серной кислоты; готов к использованию	1 x 6 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Промывочный буфер после разведения следует хранить при 2-8 °С и использовать максимум в течение 4 недель. Следует избегать микробной контаминации. Качество набора не гарантируется, если срок годности набора истек.

Перед использованием все реагенты и стрипы должны быть доведены до комнатной температуры (20-25 °С). Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной (20-25 °С). Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застежку. Неиспользованные стрипы немедленно вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °С.

Субстрат бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел голубую окраску, он становится непригодным для использования.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизированная вода.

6.2. Оборудование

- Пробирки для разведения образцов
- Трансфер-пипетка для образцов кала (кат. № Z0001)
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 50 - 100 мкл и 1 мл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Таймер
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка (300 мкл)
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, оптимальное значение референтной длины волны ≥ 600 нм)
- Бумажные полотенца (или фильтровальная бумага)
- Контейнер для утилизации отходов, содержащий 0,5% раствор гипохлорита

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.

- Положительный контроль содержит частично денатурированный токсин *C. difficile*, дающий положительную реакцию в тесте на цитотоксичность. Как и образцы пациентов, так и контроль следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Не пипетируйте ртом образцы или реагенты; необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Раствор для разведения образцов и конъюгат содержат 0,1% азид натрия в качестве консерванта. Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
- Промывочный буфер содержит 0,1% тимеросал в качестве консерванта. Следует избегать его контакта с кожей или слизистыми.
- Перекись мочевины может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 1N серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C в течение одного часа.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Образцы кала до анализа следует хранить при температуре 2-8 °C. Если нет возможности провести исследование в течение 3 дней, образцы рекомендуется заморозить и хранить при температуре минус 20 °C и ниже. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Не помещайте образцы кала и ректальные мазки в емкости, содержащие транспортировочные среды с консервантами, сыворотками крови животных, ионами металлов, окислителями или детергентами, поскольку все они могут влиять на результаты анализа RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B.

При использовании ректальных мазков проследите, чтобы образец содержал необходимое для проведения теста количество кала (около 100 мг). При мониторинге следует также отбирать образцы кала у всех, бывших в контакте с пациентом, но не имеющих клинических симптомов, для выявления асимптоматических носителей.

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите все реагенты и стрипы [Plate] до комнатной температуры (20-25 °C). Не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока их температура не достигнет комнатной. Тщательно перемешайте реагенты непосредственно перед использованием. После вскрытия стрипы (в запечатанном пакете) и реагенты необходимо хранить при 2-8 °C. Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы. Для предотвращения перекрестной контаминации необходимо предохранять образцы от контакта с компонентами набора. Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время анализа. Для предотвращения испарения реагентов рекомендуем при инкубациях закрывать планшет со стрипами крышкой или пленкой.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера [Wash] смешать с 9 частями дистиллированной воды (разведение 1:10). Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C. Готовый буфер можно хранить в течение 4 недель при температуре 2-8 °C.

9.3. Подготовка образцов

Образцы кала разведите 1:11 (по объему) с помощью RIDASCREEN® буфера для разведения образцов кала следующим образом.

Внесите 1 мл RIDASCREEN® буфера для разведения образцов [Diluent] в промаркированную пробирку. Наберите около 100 мкл жидкого кала в одноразовую пипетку для образцов кала (Art. № Z0001) до второго утолщения и разведите в 1 мл буфера для разведения образцов. Если кал твердый, возьмите эквивалентное количество (размером с горошину, около 50-100 мг) шпателем или одноразовой инокуляционной петлей и разведите его в растворе. Измельчите образец, набирая и выпуская суспензию кала в буфере пипеткой или тщательно размешивая его на вортексе. После кратковременного отстаивания надосадочную жидкость суспензии кала можно непосредственно использовать в анализе. При применении автоматического ИФА анализатора необходимо использовать надосадочную жидкость без примеси частиц. Для этого образец следует центрифугировать при 5000 об/мин (около 2300 – 2500 g) в течение примерно 5 минут.

Ректальные мазки перемешивают в 1 мл буфера для разведения образцов кала, периодически отжимая тампон о стенку пробирки. После тщательного перемешивания суспензию используют в анализе.

9.4. Исследование клеточных колоний

Для исследования колоний клеток, выросших при культивировании в CCF-агаре, соберите колонии инокуляционной петлей и суспендируйте их в 1 мл буфера для разведения образцов **Diluent**. Суспензию центрифугируйте в течение 5 минут при 2300-2500 г до прозрачности. Прозрачный супернатант можно непосредственно использовать в анализе.

9.5. Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 100 мкл положительного контроля **Control +**, или отрицательного контроля (буфера для разведения образцов **Diluent**), или разведенного образца кала. Инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) в течение 60 минут.

9.6. Промывка

Тщательная промывка необходима для получения правильных результатов. Она должна выполняться строго по инструкции. Вылейте или аспирируйте содержимое лунок в контейнер для отходов с дезинфицирующим раствором (гипохлоритом). Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Внесите по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку, после чего удалите жидкость из лунок. Повторите цикл промывки 4 раза (всего 5 промывок). После каждого цикла промывки удаляйте остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о сухую, не использованную ранее фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для планшетов следует убедиться, что оно подходит для данного типа планшетов. Помимо этого, если в суспензии кала оставались частички, необходимо удалить их из лунок вручную центрифугированием до проведения первого цикла промывки. Это позволит избежать засорения игл промывочного устройства. Следите за тем, чтобы промывочное устройство целиком заполняло ячейки жидкостью и полностью удаляло ее. После последнего цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Для достижения оптимальной промывки рекомендуется использовать режим переполнения (по меньшей мере, 600 мкл промывочного буфера на лунку). Если число промывок будет превышать 5, это улучшит результат промывки.

9.7. Вторая инкубация

Внесите в каждую лунку по 1 капле (или 50 мкл) конъюгата **Conjugate**. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре (20-25 °C).

9.8. Промывка

Промойте планшет 5 раз, как описано в п. 9.6.

9.9. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 2 капли (100 мкл) субстрата **Substrate**. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте.

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 1 капле (50 мкл) стоп-реагента **Stop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 600 нм) против бланка по воздуху (т.е. без планшета).

Примечание: В лунках с сильно положительными образцами может образовываться темный осадок.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества положительный и отрицательный контроли должны включаться в каждую серию определений, поскольку это позволяет убедиться в стабильности использованных реагентов и правильной постановке анализа. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность (ОП) отрицательного контроля ниже 0,2 и оптическая плотность положительного контроля выше 0,8 при длине волны 450 нм. Если оптическая плотность отрицательного контроля выше 0,2, это может свидетельствовать о недостаточной отмывке.

Если значения контролей не соответствуют предъявляемым требованиям, или субстрат помутнел или окрасился в голубой цвет до внесения в лунки, это может свидетельствовать об истечении срока годности реагентов. Пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа

- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ

11.1. Расчет уровня отсечения (cut-off)

Уровень отсечения (cut-off) рассчитывают, прибавляя 0,15 единиц оптической плотности к измеренной оптической плотности отрицательного контроля.

$$\text{cut-off} = \text{оптическая плотность отрицательного контроля} + 0,15$$

11.2. Интерпретация результатов

Образцы считаются **положительными**, если значение их оптической плотности более чем на 10% выше рассчитанного cut-off.

Образцы, значение оптической плотности которых выше или ниже уровня отсечения в пределах 10% ($\pm 10\%$), нельзя считать четко положительными или четко отрицательными. Результат следует считать **неопределенным** (серая зона). Рекомендуется протестировать эти образцы повторно. Если при повторном анализе свежеобработанного образца кала результат снова окажется неопределенным, образец следует считать отрицательным.

Образцы считаются **отрицательными**, если значение оптической плотности более чем на 10% ниже рассчитанного cut-off.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B выявляет токсины А и В *Clostridium difficile* в образцах кала. Тест не может быть использован для установления зависимости между значениями оптической плотности и выраженностью клинической картины. **Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клиническим диагнозом.**

Положительный результат не исключает присутствия в образце других патогенных микроорганизмов.

Отрицательный результат в целом не исключает возможности инфекции *Clostridium difficile*. Это может быть вызвано прерывистой экскрецией вируса или недостаточным для определения количеством антигенов в образце. Если у пациента анемия или имеется обоснованное подозрение на наличие инфекции *Clostridium difficile*, следует провести анализ другого образца кала этого пациента через четыре недели.

Неопределенный результат может быть связан с неравномерным распределением вируса в образце кала. В этом случае следует выполнить анализ другой суспензии того же образца кала или анализ другого образца кала.

Положительный результат посева при одновременном не выявлении токсинов в кале указывает на наличие атоксигенных штаммов *C. difficile*. В этом случае подозрительные колонии следует проверить методом ИФА на выработку токсинов.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Контроль качества

Сравнительное исследование проводили на 79 клинических образцах кала (48 отрицательных и 31 положительный образец). Проверяли надежность (чувствительность и специфичность) теста RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B. В таблице 2 приведены результаты сравнения данного теста и теста на цитотоксичность.

Таблица 2. Сравнение результатов теста RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B с ранее определенными образцами.

		RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B	
		+	-
Стандартный метод	+	30	1
	-	0	48

чувствительность:	96,8%
специфичность:	100,0%
предсказанное положительное значение:	100,1%
предсказанное отрицательное значение:	98,8%

Таблица 3. Сравнение результатов теста RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B и двух других коммерческих тестов со стандартным методом референсных значений без предполагаемых клинических исследований.

		RIDASCREEN®		ИФА1		ИФА2	
		+	-	+	-	+	-
Референсные значения	+	55	5	56	4	53	7
	-	0	323	0	323	0	323

По таблице можно рассчитать следующие значения для RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B:

чувствительность:	91,7%
специфичность:	100,0%
предсказанное положительное значение:	100,0%
предсказанное отрицательное значение:	98,5%

13.2. Перекрестная реактивность

С помощью набора RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B были протестированы наиболее распространенные кишечные патогены и другие микроорганизмы, время от времени обнаруживаемые в кале. Концентрация микроорганизмов в суспензиях составляла от 10^5 до 10^8 в мл. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4. Перекрестная реакция с патогенными микроорганизмами.

Микроорганизм	Происхождение	Результат	Результат анализа в ед. оптической плотности
			суспензия
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	DSM 2403	Отрицательный	0,036
<i>Aeromonas hydrophilia anaerogenes</i>	DSM 30022	Отрицательный	0,013
<i>Aeromonas hydrophilia hydrophilia</i>	DSM 30016	Отрицательный	0,021
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30047	Отрицательный	0,020
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	Отрицательный	0,011
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	Отрицательный	0,014
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	Отрицательный	0,013
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 20477	Отрицательный	0,021
<i>Escherichia coli</i>	Изолят	Отрицательный	0,013
<i>Escherichia coli</i>	Изолят	Отрицательный	0,018
<i>Escherichia coli</i>	Изолят	Отрицательный	0,005
<i>Escherichia hermanii</i>	DSM 4560	Отрицательный	0,012
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 20481	Отрицательный	0,019
<i>Listeria innocua</i>	SLCC 5639	Отрицательный	0,014
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788	Отрицательный	0,012
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479	Отрицательный	0,027
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 30119	Отрицательный	0,016
<i>Providencia stuartii</i>	DSM 6676	Отрицательный	0,014
<i>Pseudomonas arruginosa</i>	DSM 939	Отрицательный	0,016
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 4358	Отрицательный	0,006
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50124	Отрицательный	0,006
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291	Отрицательный	0,012
Микроорганизм	Происхождение	Результат	Результат анализа в ед. оптической плотности
<i>Salmonella Agona</i>	Изолят	Отрицательный	0,006
<i>Salmonella Choleraesuis</i>	DSM 4224	Отрицательный	0,010
<i>Salmonella Infantis</i>	Изолят	Отрицательный	0,045
<i>Salmonella Ohio</i>	Изолят	Отрицательный	0,006
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Изолят	Отрицательный	0,013
<i>Serratia proteamaculans</i>	DSM 4487	Отрицательный	0,023
<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782	Отрицательный	0,014
<i>Shigella sonnei</i>	DSM 5570	Отрицательный	0,013
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20372	Отрицательный	0,033
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Изолят	Отрицательный	0,043

<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Изолят	Отрицательный	0,007
<i>Streptococcus uberis</i>	Изолят	Отрицательный	0,003
<i>Escherichia coli</i> (O157:H-)	Изолят	Отрицательный	0,010
<i>Escherichia coli</i> (O116:H21)	Изолят	Отрицательный	0,009
<i>Escherichia coli</i> (O111:H-)	Изолят	Отрицательный	0,003
<i>Escherichia coli</i> (O26:H8)	Изолят	Отрицательный	0,001
Отрицательный контроль			0,024
Положительный контроль			1,963
Cut-off – 0,007 + 0,150 = 0,147			0,174
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Отрицательный	0,104
<i>Salmonella enteritidis</i>	DSM 9898	Отрицательный	0,098
<i>Campilobacter jejuni</i>	DSM 4688	Отрицательный	0,123
<i>Campilobacter coli</i>	DSM 4689	Отрицательный	0,106
<i>Campilobacter fetus</i>	DSM 5361	Отрицательный	0,082
<i>Morganella morganii</i>	DSM 6675	Отрицательный	0,084
Положительный контроль			2,093
Отрицательный контроль			0,078
Уровень отсечения (cut-off)			0,228

13.3. Воспроизводимость данных

Воспроизводимость внутри опыта определяли в 24 повторностях на высоко-, средне- и низкочувствительной суспензии токсина в образцах, разведенных буфером для разведения, и в отрицательном контроле.

Воспроизводимость внутри опыта определялась в одинаковых образцах в 6-х последовательных повторностях. В таблицах 5 и 6 показаны специфические значения для стандартного отклонения коэффициента вариации изменения оптической плотности.

Таблица 5. Воспроизводимость данных в тесте RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B
Воспроизводимость данных внутри одного измерения.

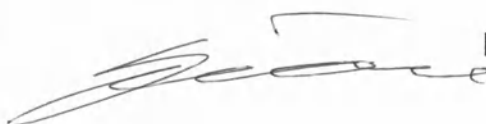
Образец	RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B					
	manually	Std. Dev.	VC %	Automat (DSX)	Std. Dev.	VC %
Отрицательный контроль	0,043	0,001	3,3	0,003	0,001	27,2
Сильно положительный	2,007	0,094	4,7	2,325	0,102	4,4
Средне положительный	1,104	0,050	4,5	1,293	0,076	5,9
Слабо положительный	0,801	0,047	5,9	0,922	0,053	5,8

Таблица 6. Воспроизводимость данных в тесте RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B между различными измерениями.

Образец	RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B					
	manually	Std. Dev.	VC %	Automat (DSX)	Std. Dev.	VC %
Отрицательный контроль	0,043	0,001	1,6	0,010	0,003	26,0
Сильно положительный	1,717	0,123	7,1	2,193	0,201	9,2
Средне положительный	0,885	0,060	6,8	1,248	0,072	5,7
Слабо положительный	0,644	0,045	7,0	0,922	0,091	9,9

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»
М.И. Прищепа
«16» ноября 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения энтеротоксина клостридий перфрингенс
(RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin

Иммуноферментный тест для качественного определения энтеротоксина *Clostridium perfringens* в образцах кала человека

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin – диагностическая *in vitro* тест-система для выявления энтеротоксина *Clostridium perfringens* в образцах кала.

2. ВВЕДЕНИЕ

C. perfringens, как и все другие клостридии, является повсеместной спорообразующей грамположительной бактерией, которая регулярно обнаруживается в каловой флоре человека. Она отличается от других клостридий отсутствием периферических ресничек (равномерно распределенных по поверхности). Имеется пять типов *C. perfringens* (А - Е). Наиболее важны тип А и, при определенных условиях (диета, недостаток трипсина), тип С, которые главным образом и обуславливают некрозы кишечника. Все упомянутые типы обнаружены и у животных.

Классификация в этих группах связана с их способностью вырабатывать основные токсины (альфа-, бета-, эпсилон- и йота-токсин). Все эти токсины оказывают цитотоксическое и некротическое действие. Помимо этих четырех токсинов, штаммы *C. perfringens* продуцируют ряд других токсинов, среди которых энтеротоксин, полипептид с молекулярной массой 35 кДа, имеет патогенное значение для человека.

Пищевое отравление, вызванное этим энтеротоксином *C. perfringens* (СПЭ) известен давно. При употреблении неправильно хранившейся пищи, особенно не подвергавшейся тепловой обработке, велика вероятность заражения *C. perfringens*. В результате заражения формируется большое количество токсинов и, соответственно, развиваются кишечные заболевания, сопровождаемые диареей и спазмами в области живота. Симптомы появляются через 8 – 24 часов после употребления бактериально-загрязненной пищи и исчезают в последующие 24 часа. Реже эти симптомы сопровождаются рвотой, лихорадкой и головной болью. В дополнение к пищевым отравлениям, вызванным СПЭ, в последние годы выявлено все возрастающее количество случаев ассоциированной с антибиотиками диареи (ААД), вызванной *C. perfringens* (примерно 10% всех случаев), а также спорадически появляющейся диареи (СПОД) в 5 – 20% всех случаев, не вызванных пищевыми отравлениями.

Причина этой формы диареи, вплоть до псевдомембранозного колита (ПМК), гораздо более серьезна, и продолжительность заболевания выше (10 – 30 дней). В этих случаях в кале также часто обнаруживают примесь крови и слизи. Гистологическое исследование нижнего отдела толстого кишечника и прямой кишки выявляет отечные области, возникшие в результате поражения, вызванного СПЭ.

Последние исследования показали, что энтеротоксин может кодироваться как в хромосомах, так и в эписомах, но, тем не менее, содержит одну и ту же последовательность аминокислот. Далее было обнаружено, что изоляты, выявляемые в случаях пищевого отравления, всегда формируют кодированный хромосомами СПЭ, тогда как изоляты от пациентов с ААД или СПОД формируют кодированный плазмидами СПЭ.

Значительно большее воздействие СПЭ в случаях ААД и СПОД, возможно, обусловлено состоянием здоровья пораженных носителей: они или уже страдают от другого заболевания, либо их иммунная система

ослаблена в связи с возрастом. Повышенная восприимчивость к болезни, а также большое число постоянных носителей *C. perfringens* обнаруживаются главным образом у пожилых людей, особенно живущих в домах престарелых, а также у госпитализированных пациентов.

Тест RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin вместе с тестом RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B представляет собой еще одну важную тест-систему для изучения ассоциированной с антибиотиками диареи и спорадически появляющейся диареи.

Благодаря этой тест-системе становится возможной быстрая и надежная постановка диагноза, необходимая при выборе правильного лечения.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный тест основан на твердофазном «сэндвич» методе иммуноферментного анализа (ИФА). В тесте RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin используются высокоспецифичные антитела. На поверхности лунок планшета сорбированы поликлональные антитела к эпитопам энтеротоксина *C. perfringens*.

Аликвота суспензии кала вносится в лунку и инкубируется одновременно с конъюгатом моноклональных антител к энтеротоксину *C. perfringens* с пероксидазой из корня хрена. В результате образуется «сэндвич», в котором энтеротоксин *C. perfringens* оказывается между антителами твердой фазы и антителами, мечеными ферментом. Затем лунки отмываются для удаления несвязавшихся меченых ферментом антител.

Если результат теста положительный, то после добавления субстрата фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат в голубую жидкость. Добавление стоп-реагента меняет ее цвет на желтый. Оптическую плотность измеряют при длине волны 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 600 нм). Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации энтеротоксина *C. perfringens* в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: 96-луночный, в рамке-держателе, разделяемый на двенадцать 8-луночных стрипов, с иммобилизованными специфичными антителами к эпитопам энтеротоксина <i>C. perfringens</i> ; содержат 0,1% Kathon; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
Diluent	Буфер для разведения образцов: забуференный белковый раствор NaCl; содержит 0,1% NaN ₃ ; красного цвета; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash	Промывочный буфер: 10x концентрат, фосфатный буферный раствор с NaCl; содержит 0,1% тимерозал (мертиолят)	1 x 100 мл
Control +	Положительный контроль: инактивированный энтеротоксин <i>C. perfringens</i> ; содержит 0,05% проклин 300; красного цвета; готов к использованию	1 x 1,8 мл
Conjugate	Конъюгат фермента: моноклональные антитела к энтеротоксину <i>C. perfringens</i> , конъюгированные с пероксидазой хрена; в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,1% Kathon; синего цвета; готов к использованию	1 x 10 мл
Substrate	Субстратный раствор: тетраметилбензидин / пероксид мочевины; готов к использованию	1 x 10 мл
Stop	Стоп-реагент: 1N раствор серной кислоты; готов к использованию	1 x 6 мл
	Инструкция по применению	

5. Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Пробирки для разведения образцов
- Одноразовые пипетки для образцов кала (Art. № Z0001)
- Вортекс (необязательно, см. п. 9.3)
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 50 - 100 мкл и 1 мл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Таймер
- Устройство для промывки планшетов или многоканальные пипетки (300 мкл)
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, при необходимости референтный фильтр с длиной волны ≥ 600 нм)
- Фильтровальная бумага
- Контейнер для отработанных материалов, содержащий 0,5% раствор гипохлорита

6. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Промывочный буфер после разведения следует хранить при 2-8 °С и использовать максимум в течение 4 недель. Следует избегать микробной контаминации. Качество набора не гарантируется, если срок годности набора истек.

Перед использованием все реагенты и стрипы должны быть доведены до комнатной температуры (20-25 °С). Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов, не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной (20-25 °С). Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застежку. Неиспользованные стрипы немедленно вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °С.

Субстрат бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел голубую окраску, он становится непригодным для использования.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Положительный контроль содержит инаktivированный энтеротоксин *C. perfringens*. Однако, как контроль, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности, предусмотренные государственным законодательством.
- Не следует пипетировать ртом образцы или реагенты, необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Буфер для разведения образцов содержит 0,1% NaN₃, а конъюгат - 0,1% Kathon в качестве консерванта. Следует избегать контакта этих веществ с кожей или слизистыми.
- Промывочный буфер содержит 0,1% тимерозал (мертиолят). Следует избегать его контакта с кожей или слизистыми.
- Пероксид мочевины может вызвать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 1N серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121°C, по меньшей мере, в течение одного часа.
- **ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Образцы кала до анализа следует хранить при температуре 2-8 °С. Если нет возможности провести исследование в течение 3 дней, образцы рекомендуется заморозить и хранить при температуре минус 20 °С и ниже. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Не помещайте образцы кала и ректальные мазки в емкости, содержащие транспортировочные среды с консервантами, сыворотками крови животных, ионами металлов, окислителями или детергентами, поскольку все они могут влиять на результаты анализа RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin.

При использовании ректальных мазков проследите, чтобы образец содержал необходимое для проведения теста количество кала (около 100 мг). При мониторинге следует также отбирать образцы кала у всех, бывших в контакте с пациентом, но не имеющих клинических симптомов, для выявления асимптоматических носителей.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите все реагенты и стрипы [Plate] до комнатной температуры (20-25 °С). Не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока их температура не достигнет комнатной. Тщательно перемешайте реагенты непосредственно перед использованием. После вскрытия стрипы (в запечатанном пакете) и реагенты необходимо хранить при 2-8 °С. Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы. Для предотвращения перекрестной контаминации необходимо предохранять образцы от контакта с компонентами набора. Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время анализа. Для предотвращения испарения реагентов рекомендуем при инкубациях закрывать планшет со стрипами крышкой или пленкой.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера **Wash** смешать с 9 частями дистиллированной воды (**разведение 1:10**). Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C. Готовый буфер можно хранить в течение 4 недель при температуре 2-8 °C.

9.3. Подготовка образцов

Образцы кала разведите **1:11** (по объему) с помощью RIDASCREEN® буфера для разведения образцов кала следующим образом.

Внесите 1 мл RIDASCREEN® буфера для разведения образцов **Diluent** в промаркированную пробирку. Наберите около 100 мкл жидкого кала в одноразовую пипетку для образцов кала (Art. № Z0001) до второго утолщения и разведите в 1 мл буфера для разведения образцов. Если кал твердый, возьмите эквивалентное количество (размером с горошину, около 100 мг) шпателем или одноразовой инокуляционной петлей и разведите его в растворе. Измельчите образец, набирая и выпуская суспензию кала в буфере пипеткой или тщательно размешивая его на вортексе. После кратковременного отстаивания надосадочную жидкость суспензии кала можно непосредственно использовать в анализе. При использовании автоматического ИФА анализатора **необходимо** использовать надосадочную жидкость без примеси частиц. Для этого образец следует отцентрифугировать при 5000 об/мин (около 2300 – 2500 g) в течение примерно 5 минут.

Ректальные мазки перемешивают в 1 мл буфера для разведения образцов кала, периодически отжимая тампон о стенку пробирки. После тщательного перемешивания суспензию используют в анализе.

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 2 капли (или 100 мкл) положительного контроля **Control +**, или отрицательного контроля (буфера для разведения образцов **Diluent**), или разведенного образца кала. В каждую лунку добавьте по 2 капли (или 100 мкл) конъюгата фермента с антителами **Conjugate**. Тщательно перемешайте содержимое лунок осторожными круговыми движениями планшета по поверхности стола. Инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) в течение 60 минут.

9.5. Промывка

Тщательная промывка необходима для получения правильных результатов. Она должна выполняться строго по инструкции. Вылейте или отсосите содержимое лунок в контейнер для отходов с дезинфицирующим раствором (гипохлоритом). Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Внесите по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку, после чего удалите жидкость из лунок. Повторите цикл промывки 4 раза (всего 5 промывок). После каждого цикла промывки удаляйте остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о сухую, не использованную ранее фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для планшетов следует убедиться, что оно подходит для данного типа планшетов. Помимо этого, если в суспензии кала оставались частички, необходимо удалить их из лунок вручную центрифугированием до проведения первого цикла промывки. Это позволит избежать засорения игл промывочного устройства. Следите за тем, чтобы промывочное устройство целиком заполняло ячейки жидкостью и полностью удаляло ее. После последнего цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Для достижения оптимальной промывки рекомендуется использовать режим переполнения (по меньшей мере 600 мкл промывочного буфера на лунку). Если число промывок будет превышать 5, это улучшит результат промывки.

9.6. Вторая инкубация

Внесите в каждую лунку по 2 капли субстрата **Substrate**. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте.

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 1 капле (50 мкл) стоп-реагента **Stop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 600 нм) против бланка по воздуху (т.е. без планшета).

Примечание:

При очень высокой концентрации энтеротоксина в образце пациента в лунках с субстратом может образовываться темный осадок.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Доведите все реагенты до комнатной температуры (20-25 °C).
2. Приготовьте промывочный буфер.
3. Приготовьте суспензию кала.

4. Внесите в лунки по 2 капли разведенного образца, или положительного контроля, или отрицательного контроля.
5. Добавьте по 2 капли конъюгата фермента; инкубируйте в течение 60 минут при комнатной температуре (20-25 °C).
6. Удалите содержимое лунок и промойте 5 раз, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку.
7. Внесите по 2 капли субстрата; инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте.
8. Добавьте 1 каплю стоп-реагента, измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества положительный и отрицательный контроли должны включаться в каждую серию определений, поскольку это позволяет убедиться в стабильности использованных реагентов и правильной постановке анализа. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность (ОП) отрицательного контроля ниже 0,2 и оптическая плотность положительного контроля выше 0,8 при длине волны 450 нм. Если оптическая плотность отрицательного контроля выше 0,2, это может свидетельствовать о недостаточной отмывке. Если значения контролей не соответствуют предъявляемым требованиям или субстрат помутнел или окрасился в голубой цвет до внесения в лунки, это может свидетельствовать об истечении срока годности реагентов. Пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ

11.1. Расчет уровня отсечения (cut-off)

Уровень отсечения (cut-off) рассчитывают, прибавляя 0,15 единиц оптической плотности к измеренной оптической плотности отрицательного контроля.

$$\text{cut-off} = \text{оптическая плотность отрицательного контроля} + 0,15$$

11.2. Интерпретация результатов

Образцы считаются **положительными**, если значение их оптической плотности более чем на 10% выше рассчитанного cut-off.

Образцы, значение оптической плотности которых выше или ниже уровня отсечения в пределах 10% ($\pm 10\%$), нельзя считать четко положительными или четко отрицательными. Результат следует считать **неопределенным** (серая зона). Рекомендуется протестировать эти образцы повторно. Если при повторном анализе свежесобранного образца кала результат снова окажется неопределенным, образец следует считать отрицательным.

Образцы считаются **отрицательными**, если значение оптической плотности более чем на 10% ниже рассчитанного cut-off.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin выявляет энтеротоксин *C. perfringens* в образцах кала. Тест не может быть использован для установления зависимости между значениями оптической плотности и выраженностью клинической картины. **Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клиническим диагнозом.**

Положительный результат на энтеротоксин *C. perfringens* не исключает присутствия в образце других патогенных микроорганизмов.

Отрицательный результат в целом не исключает инфицирования *C. perfringens*. Это может быть вызвано прерывистой экскрецией энтеротоксина или недостаточным для определения количеством энтеротоксина в образце. Если у пациента анемия или имеется обоснованное подозрение на наличие данной инфекции, следует провести анализ другого образца кала этого пациента через четыре недели.

Неопределенный результат может быть связан с неравномерным обсеменением бактерией образца кала. В этом случае следует выполнить анализ другой суспензии того же образца кала или анализ другого образца кала.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Перекрестная реактивность

Специфичность тест-системы RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin исследовали, проводя анализ с широко распространенными патогенными микроорганизмами кишечной микрофлоры и другими организмами, случайно присутствующими в кале. Суспензии содержали микроорганизмы в концентрации от 10^5 до 10^8 в мл. Перекрестная реактивность не выявлена. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Перекрестная реактивность с патогенными микроорганизмами.

Микроорганизм	Источник	Результат	Суспензия
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	DSM 2403	отрицательный	0,002
<i>Aeromonas hydrophilia anaerogenes</i>	DSM 30022	отрицательный	0,002
<i>Aeromonas hydrophilia hydrophilia</i>	DSM 30016	отрицательный	0,004
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30047	отрицательный	0,004
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	отрицательный	0,004
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	отрицательный	0,008
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	отрицательный	0,005
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477	отрицательный	0,010
<i>Escherichia coli</i>	изолят	отрицательный	0,002
<i>Escherichia coli</i>	изолят	отрицательный	0,005
<i>Escherichia coli</i>	изолят	отрицательный	0,004
<i>Escherichia hermannii</i>	DSM 4560	отрицательный	0,003
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 20481	отрицательный	0,008
<i>Listeria innocua</i>	SLCC 5639	отрицательный	0,006
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788	отрицательный	0,003
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479	отрицательный	0,005
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 30119	отрицательный	0,000
<i>Providencia stuartii</i>	DSM 6676	отрицательный	0,001
<i>Pseudomonas arruginosa</i>	DSM 939	отрицательный	0,018
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 4358	отрицательный	0,007
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50124	отрицательный	0,003
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291	отрицательный	0,007
<i>Salmonella agona</i>	изолят	отрицательный	0,003
<i>Salmonella choleraesuis</i>	DSM 4224	отрицательный	0,005
<i>Salmonella infantis</i>	изолят	отрицательный	0,005
<i>Salmonella Ohio</i>	изолят	отрицательный	0,006
<i>Salmonella typhimurium</i>	изолят	отрицательный	0,004
<i>Serratia proteamaculans</i>	DSM 4487	отрицательный	0,003
<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782	отрицательный	0,003
<i>Shigella sonnei</i>	DSM 5570	отрицательный	0,004
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20372	отрицательный	0,014
<i>Streptococcus agalactiae</i>	изолят	отрицательный	0,001
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	изолят	отрицательный	0,000
<i>Streptococcus uberis</i>	изолят	отрицательный	0,005
<i>Escherichia coli</i> (O157:H-)	изолят	отрицательный	0,001
Микроорганизм	Источник	Результат	Суспензия
<i>Escherichia coli</i> (O116:H21)	изолят	отрицательный	0,000
<i>Escherichia coli</i> (O111:H-)	изолят	отрицательный	0,001
<i>Escherichia coli</i> (O26:H8)	изолят	отрицательный	0,002
Отрицательный контроль (TSB)			0,004
Положительный контроль (набор)			2,018
Уровень отсечения (cut-off)			0,150
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	отрицательный	0,000
<i>Campilobacter coli</i>	DSM 4689	отрицательный	-0,001
<i>Campilobacter fetus</i>	DSM 5361	отрицательный	0,000
<i>Campilobacter jejuni</i>	DSM 4688	отрицательный	0,001
<i>Morganella morganii</i>	DSM 6675	отрицательный	0,003

<i>Salmonella enteritis</i>	DSM 9898	отрицательный	0,001
Положительный контроль			2,091
Отрицательный контроль			0,001
Уровень отсека (cut-off)			0,151

13.2. Точность

Воспроизводимость внутри опыта оценивали, анализируя три образца кала с различными концентрациями энтеротоксина *C. perfringens* в 24 повторах, используя набор одной и той же серии. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Воспроизводимость внутри опыта.

Воспроизводимость внутри опыта (n = 24)			
Образец	Средняя оптическая плотность	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
A	2,494	0,0302	1,21
B	1,253	0,0471	3,76
C	0,549	0,0337	6,13
Отрицательный контроль	0,051	0,0046	8,96
Среднее			5,1

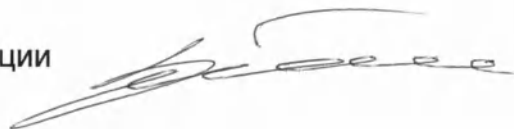
Воспроизводимость между опытами оценивали, анализируя три образца кала с различными концентрациями энтеротоксина *C. perfringens* в 5 опытах, каждый раз используя наборы разных серий. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Воспроизводимость между опытами.

Воспроизводимость между опытами (n = 5)			
Образец	Средняя оптическая плотность	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
A	2,481	0,0464	1,87
B	1,213	0,0757	6,24
C	0,58	0,0198	3,41
Отрицательный контроль	0,054	0,0051	9,37
Среднее			5,22

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

10 ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения криптоспоридий
(RIDASCREEN® Cryptosporidium)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Cryptosporidium

Иммуноферментный тест для обнаружения криптоспоридий в образцах кала.

Набор на 96 определений**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор предназначен для диагностического обнаружения *in vitro* *Cryptosporidium parvum* в образцах кала.

2. ВВЕДЕНИЕ

Криптоспоридиоз – инфекция, вызываемая простейшими класса *Cryptosporidium*. Это паразиты, которые в основном встречаются у животных и обнаруживаются как наиболее важные патогенные организмы у домашних животных, в частности, у телят. В различных странах эта инфекция у человека наблюдается чаще, чем считалось ранее. В тропических районах развивающихся стран паразит часто является эндемичным и вызывает эпидемии диареи у детей. У иммунокомпетентных людей это заболевание проходит как самоизлечивающийся гастроэнтерит. Диарея продолжается от 3 до 10 дней и может сопровождаться лихорадкой и желудочно-кишечными симптомами, такими как тошнота и боли, похожие на симптомы жиардиоза (лямблиоза). Симптомы и последствия значительно более серьезны у пациентов с нарушениями в иммунной системе, у которых диарея устойчиво сохраняется и протекает очень тяжело. Как и в случае холеры, инфекция приводит к угрожающему жизни обезвоживанию организма. Описаны случаи, когда потеря жидкости составляла от 3 до 12 л в день. Инфекция криптоспоридиями может передаваться через загрязненную воду от животных к человеку, а также от человека к человеку. Жители фермерских хозяйств, дети в детских учреждениях и представители групп риска, такие как мужчины-гомосексуалисты и ВИЧ-инфицированные в особенности подвержены опасности заболевания. В прошлом наиболее обычным способом диагностики криптоспоридиоза было микроскопическое обнаружение ооцист в образцах кала или микроскопическое исследование небольших образцов биопсии кишечника; для проведения этих анализов требовался высококвалифицированный опытный персонал. Новый иммуноферментный метод определения антигенов *Cryptosporidium*, описанный здесь, является важным альтернативным способом для исследования образцов кала. Чувствительность этого теста равноценна методу микроскопического исследования и для выполнения теста не требуется участия специализированного персонала, обученного в области паразитологии. Это легкая и не требующая долгого времени процедура не зависит от того, присутствует ли в образцах кала интактный организм.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

В иммуноферментном тесте RIDASCREEN® *Cryptosporidium* используются специфические антитела и принцип сэндвич-анализа. На поверхность лунок микропланшета адсорбируют специфические антитела к антигенам *Cryptosporidium parvum*. В лунки вносят разведенные тестируемые образцы кала и контроли. После процедуры промывки в лунки вносят антитела к антигенам *C. parvum*, конъюгированные с пероксидазой хрена, и инкубируют при комнатной температуре (20-25 °C).

Если в образце присутствуют антигены *C. parvum*, образуется сэндвич-комплекс, сформированный иммобилизованными антителами, антигенами *C. parvum* и антителами, конъюгированными с ферментом. Несвязавшиеся меченные ферментом антитела удаляют промывкой. В этом случае после внесения субстрата фермент, связавшийся с лунками, превращает бесцветный субстрат в окрашенный в синий цвет продукт. Добавление стоп-реагента меняет окраску с синего цвета на желтый. Оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации антигена *C. parvum*, присутствующего в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет 96-луночный: в рамке-держателе, состоящий из двенадцати 8-луночных стрипов с отделяемыми лунками, с адсорбированными в них моноклональными антителами мыши к <i>Cryptosporidium</i> ; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
Diluent	Буфер для разведения образцов: белковый забуференный раствор NaCl, 0,1% Kathon; окрашен в синий цвет; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash	Промывочный буфер: 10x концентрат; содержит фосфатный буфер, NaCl, 0,1% тимерозал (мертиолят)	1 x 100 мл
Control +	Положительный контроль: инактивированные антигены <i>C.parvum</i> ; содержит 0,1% Kathon в качестве консерванта; готов к использованию	1 x 1,8 мл
Conjugate	Конъюгат фермента: антитела к <i>C.parvum</i> , конъюгированные с пероксидазой хрена; в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,1% Kathon; окрашен в синий цвет; готов к использованию	1 x 10 мл
Substrate	Субстратный раствор: пероксид мочевины / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 10 мл
Stop	Стоп-реагент: 1N серная кислота; готов к использованию	1 x 6 мл
	Инструкция по применению	

5. ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать только до истечения срока годности, указанного на этикетках флаконов. Разведенный промывочный буфер сохраняется в течение 4 недель при хранении при 2-8 °С. Необходимо исключить микробное загрязнение. Гарантийные обязательства при несоответствии качества набора не удовлетворяются после истечения срока его годности. Пакет из фольги необходимо открывать с помощью ножниц, не повреждая застёжку. Не использованные стрипы сразу же положите обратно в пакет из фольги, запечатайте пакет и храните его при 2-8 °С. Бесцветный раствор субстрата необходимо хранить в защищенном от света месте, чтобы избежать порчи или появления окраски в результате самоокисления. Если субстрат приобрел синее окрашивание, его использовать нельзя.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1 Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода.

6.2 Оборудование

- Пробирки для анализа
- Одноразовые трансфер-пипетки (кат. № Z0001)
- Вортекс (дополнительно, см. раздел 9.3)
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 50 - 100 мкл и на 1 мл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Таймер
- Прибор для промывания планшетов или многоканальная пипетка (300 мкл)
- Фотометр (ридер ELISA) (450 нм, при необходимости дополнительная длина волны сравнения ≥ 600 нм)
- Фильтровальная (или любая другая впитывающая бумага, например, бумажные полотенца)
- Контейнер для отходов

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Положительный контроль содержит инактивированный антиген *C. parvum*. Однако, как контроль, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Не следует пипетировать ртом образцы или реагенты, необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Буфер для разведения образцов и конъюгат содержат 0,1% Kathon в качестве консерванта. Следует избегать его контакта с кожей или слизистыми.

- Промывочный буфер содержит 0,1% тимерозаль в качестве консерванта. Следует избегать его контакта с кожей или слизистыми.
- Пероксид мочевины может вызвать ожоги. Обращайтесь с реагентом с осторожностью!
- Стоп-реагент содержит 1N серную кислоту. Избегайте контактов с кожей и одеждой! При попадании реагента на кожу промойте пораженный участок большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C, по меньшей мере, в течение одного часа.

ВНИМАНИЕ: Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Образцы для тестирования до анализа необходимо хранить при 2-8 °C. Если материал не планируют использовать в тесте в течение 3 дней, его рекомендуется хранить при -20 °C и ниже. Необходимо исключить многократное замораживание и оттаивание образцов.

Не помещайте образцы кала и ректальные мазки в емкости, содержащие транспортировочные среды с консервантами, сыворотками крови животных, ионами металлов, окислителями или детергентами, поскольку все они могут влиять на результаты анализа RIDASCREEN® Cryptosporidium.

При использовании ректальных мазков проследите, чтобы образец содержал необходимое для проведения теста количество кала (около 100 мг). При мониторинге следует также отбирать образцы кала у всех, бывших в контакте с пациентом, но не имеющих клинических симптомов, для выявления асимптоматических носителей.

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите все реагенты и стрипы [Plate] до комнатной температуры (20-25 °C). Не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока их температура не достигнет комнатной. Тщательно перемешайте реагенты непосредственно перед использованием. После вскрытия стрипы (в запечатанном пакете) и реагенты необходимо хранить при 2-8 °C. Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы. Для предотвращения перекрестной контаминации необходимо предохранять образцы от контакта с компонентами набора. Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время анализа. Для предотвращения испарения реагентов рекомендуется при инкубациях закрывать планшет со стрипами крышкой или пленкой.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера [Wash] смешать с 9 частями дистиллированной воды. Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C. Готовый буфер можно хранить в течение 4 недель при температуре 2-8 °C.

9.3. Приготовление образцов

Образцы кала разведите 1:11 (по объему) с помощью RIDASCREEN® буфера для разведения образцов кала следующим образом: внесите 1 мл RIDASCREEN® буфера для разведения образцов [Diluent] в промаркированную пробирку. Наберите около 100 мкл жидкого кала в одноразовую пипетку для образцов кала (Art. № Z0001) до второго утолщения и разведите в 1 мл буфера для разведения образцов. Если кал твердый, возьмите эквивалентное количество (размером с горошину, около 50-100 мг) шпателем или одноразовой инокуляционной лупы и разведите его в растворе. Измельчите образец, набирая и выпуская суспензию кала в буфере пипеткой или тщательно размешивая его на вортексе. После кратковременного отстаивания надосадочную жидкость суспензии кала можно непосредственно использовать в анализе. При применении автоматического ИФА анализатора **необходимо** использовать надосадочную жидкость без примеси частиц. Для этого образец следует отцентрифугировать при 5000 об/мин (около 2300 – 2500 g) в течение примерно 5 минут.

Ректальные мазки перемешивают в 1 мл буфера для разведения образцов кала, периодически отжимая тампон о стенку пробирки. После тщательного перемешивания суспензию используют в анализе.

9.4 Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 2 капли (или 100 мкл) положительного контроля [Control +], отрицательного контроля (буфера для разведения образцов [Diluent]), и разведенного образца кала. В каждую лунку добавьте по 2 капли (или 100 мкл) конъюгата фермента с антителами [Conjugate]. Тщательно перемешайте содержимое лунок осторожными

круговыми движениями планшета по поверхности стола. Инкубируйте при комнатной температуре (20 – 25 °C) в течение **60 минут**.

9.5 Промывка

Для получения точных результатов необходимо тщательно и в полном соответствии с инструкцией проводить процедуру промывки. Вещества, инкубированные в лунках, необходимо удалять в контейнер для отходов, содержащий гипохлорит в качестве дезинфицирующего раствора. Чтобы обеспечить полное удаление жидкости из лунок, постучите перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. Затем промойте планшет 5 раз, каждый раз используя по 300 мкл промывочного буфера. Убедитесь в том, что при каждом цикле промывки вы полностью удаляете жидкость из лунок, для этого энергично постучите перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге, которая каждый раз должна быть сухой и ранее неиспользованной.

При применении прибора для автоматической промывки планшетов, убедитесь в том, что прибор отрегулирован под тот тип планшета, который используется в данном тесте. Перед первой промывкой суспензию кала, которая не была освобождена от взвешенных частиц, необходимо вытряхнуть из планшета вручную, чтобы предотвратить засорение игл для промывки. Также во время промывки убедитесь в том, что после каждого цикла жидкость из лунок была откачана полностью. После финальной промывки необходимо энергично постучать перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге или бумажному полотенцу, чтобы удалить все остатки жидкости. Чтобы достигнуть оптимальных результатов промывки, рекомендуется эту процедуру проводить в режиме переполнения, используя на каждой стадии не менее 600 мкл промывочного буфера на лунку. Количество стадий промывки может превышать 5, и обычно это приводит к достижению лучших результатов.

9.6 Вторая инкубация

Добавьте в каждую лунку по **2 капли (100 мкл)** субстрата **Substrate**. Инкубируйте планшет **15 мин** при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте.

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по **1 капле (50 мкл)** стоп-реагента **Stop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 600 нм) против бланка по воздуху (т.е. без планшета).

Замечание: При очень высокой концентрации антигенов криптоспоридий в образце пациента в лунках с субстратом может образовываться темный осадок.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ПРИЗНАКИ ПРИГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для контроля за качеством теста в каждое измерение необходимо включить положительный и отрицательный контроли, чтобы убедиться в стабильности реагентов и правильном выполнении анализа. Измерение проведено правильно, если оптическая плотность (OD) отрицательного контроля при 450 нм ниже 0,2, а оптическая плотность положительного контроля при 450 нм выше 0,8. Если поглощение отрицательного контроля выше 0,2, это может указывать на недостаточно полную промывку. Если ожидаемые значения контролей не укладываются в полученные результаты или если раствор субстрата мутный или приобрел голубую окраску до того, как его внесли в лунки, это может быть указанием на то, что срок годности реагентов набора истек. Если вы не получили результаты, указанные выше, перед тем, как повторить тестирование, проверьте следующие позиции:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

11. ОЦЕНКА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

11.1 Расчеты уровня отсечения (cut-off)

Уровень отсечения определяют прибавлением 0,15 единиц поглощения к измеренному значению отрицательного контроля:

$$\text{Уровень отсечения (cut-off)} = \text{оптическая плотность отрицательного контроля} + 0,15$$

11.2 Результаты теста

Образцы считают **положительными**, если их оптическая плотность **выше** порогового уровня отсечения более чем на 10%.

Образцы, у которых оптическая плотность в пределах $\pm 10\%$ от порогового уровня не должны рассматриваться как точно положительные или точно отрицательные. Их следует относить к **промежуточным**. Если вновь проведенное тестирование свежего образца снова дает промежуточные результаты, попадающие в так называемую «серую зону» образец следует рассматривать как отрицательный.

Образцы считают **отрицательными**, если их оптическая плотность **ниже** порогового уровня отсечения более чем на 10%.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Cryptosporidium выявляет антигены *Cryptosporidium* в образцах кала. Тест не может быть использован для установления зависимости между значениями оптической плотности и выраженностью клинической картины. **Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клиническим диагнозом.**

Положительные результаты не исключают присутствия других инфекционных патогенов.

Отрицательные результаты в основном не исключают инфекцию криптоспоридиозом. Это объясняется пульсирующим выделением паразита или невысоким содержанием паразита в кале. Если пациент страдает анемией или если есть причины подозревать наличие инфекции криптоспоридиозом, следует провести анализ другого образца кала этого пациента через четыре недели.

Промежуточный результат может быть связан с неравномерным распределением антигенов *E. histolytica* в образце кала. В этом случае следует выполнить анализ другой суспензии того же образца кала или анализ другого образца кала.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Сравнительное изучение

С помощью теста RIDASCREEN® Cryptosporidium в клинике были проанализированы 276 образцов кала. Образцы брали у немецких пациентов, вернувшихся из-за границы в период между сентябрем 1999 г. и мартом 2000 г. Эти пациенты обращались с различными жалобами в амбулаторную клинику госпиталя инфекционных заболеваний и тропической медицины в Мюнхене. Все образцы исследовались на наличие яиц глист и паразитов с помощью метода прямой микроскопии после окрашивания гематоксилином железа и SAF-обогащения, при этом каждое предметное стекло изучалось двумя опытными микроскопистами в течение 10 минут. Аликвоты свежееотобранных образцов кала пациентов замораживали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ сразу же после их прибытия. После оттаивания образцы исследовали с помощью иммуоферментного метода в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Тестирование показало отсутствие перекрестной реактивности по отношению к другим кишечным паразитам. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты тестирования с помощью набора RIDASCREEN® Cryptosporidium и обычной микроскопии.

		Микроскопия	
		Положительный результат	Отрицательный результат
RIDASCREEN® Cryptosporidium	Положительный результат	9	7
	Отрицательный результат	0	260

Чувствительность	100,0%
Специфичность	97,3%
Положительные прогнозируемые значения	56,2%
Отрицательные прогнозируемые значения	100,0%

13.2. Перекрестная реактивность

Перекрестную реактивность в тесте RIDASCREEN® Cryptosporidium исследовали, проводя анализ с различными патогенными микроорганизмами кишечной микрофлоры и другими организмами, присутствующими в кале. Исследования проводили с суспензиями бактерий после выращивания их в течение ночи в BHI-среде. В качестве суспензии использовали изоляты или DSM-штаммы в концентрации 10^6 - 10^8 патогенов в мл. Образцы анализировали в дубликатах. Поглощение измеряли при 450 нм. Результаты приведены в таблице 3. Перекрестная реактивность не выявлена.

Таблица 3. Перекрестная реактивность с патогенными микроорганизмами.

Протестированные организмы	Источник	Результат	Суспензия
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	DSM 2403	Положительный	0.196
<i>Aeromonas hydrophilia anaerogenes</i>	DSM 30022	Отрицательный	-0.009
<i>Aeromonas hydrophilia hydrophilia</i>	DSM 30016	Отрицательный	-0.007
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30047	Отрицательный	-0.009
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	Отрицательный	-0.007
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	Отрицательный	-0.007
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	Отрицательный	-0.003
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477	Отрицательный	0.113
<i>Escherichia coli</i>	Изолированная	Отрицательный	-0.004
<i>Escherichia coli</i>	Изолированная	Отрицательный	-0.009
<i>Escherichia coli</i>	Изолированная	Отрицательный	-0.008
<i>Escherichia hermanni</i>	DSM 4560	Отрицательный	-0.007
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 20481	Отрицательный	-0.007
<i>Listeria innocua</i>	SLCC 5639	Отрицательный	-0.010
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788	Отрицательный	-0.006
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479	Отрицательный	-0.003
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 30119	Отрицательный	-0.006
<i>Providencia stuartii</i>	DSM 6676	Отрицательный	-0.008
<i>Pseudomonas arruginosa</i>	DSM 939	Отрицательный	-0.001
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 4358	Отрицательный	-0.009
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50124	Отрицательный	-0.006
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291	Отрицательный	-0.009
<i>Salmonella agona</i>	Изолированная	Отрицательный	-0.005
<i>Salmonella choleraesuis</i>	DSM 4224	Отрицательный	-0.005
<i>Salmonella infantis</i>	Изолированная	Отрицательный	-0.006
<i>Salmonella Ohio</i>	Изолированная	Отрицательный	-0.009
<i>Salmonella typhimurium</i>	Изолированная	Отрицательный	-0.008
<i>Serratia proteamaculans</i>	DSM 4487	Отрицательный	-0.007
<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782	Отрицательный	-0.008
<i>Shigella sonnei</i>	DSM 5570	Отрицательный	-0.010
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20372	Отрицательный	-0.005
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Изолированная	Отрицательный	-0.005
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Изолированная	Отрицательный	-0.003
<i>Streptococcus uberis</i>	Изолированная	Отрицательный	0.134
<i>Escherichia coli</i> (0157:H-)	Изолированная	Отрицательный	-0.010
<i>Escherichia coli</i> (0116:H21)	Изолированная	Отрицательный	-0.009
<i>Escherichia coli</i> (0111:H-)	Изолированная	Отрицательный	-0.007
<i>Escherichia coli</i> (026:H8)	Изолированная	Отрицательный	-0.007
Отрицательный контроль, BHI			-0.006
Положительный контроль набора			1.524
Уровень отсека			0.144
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Отрицательный	0,003
<i>Salmonella enteridis</i>	DSM 9898	Отрицательный	0,002
<i>Campylobacter jejuni</i>	DSM 4688	Отрицательный	0,001
<i>Campylobacter coli</i>	DSM 4689	Отрицательный	0,002
<i>Campylobacter fetus</i>	DSM 5361	Отрицательный	0,001
<i>Morganella morganii</i>	DSM 6675	Отрицательный	0,0

Протестированные организмы	Источник	Результат	Суспензия
Отрицательный контроль			3,517
Положительный контроль			0,001
Уровень отсечения			0,151

13.3. Перекрестная реактивность с яйцами паразитических червей и с другими паразитическими организмами

С помощью тест-системы RIDASCREEN® Cryptosporidium исследовали образцы кала с обнаруженными в них при микроскопии паразитическими организмами. В иммуноферментном анализе использовали разведение образцов 1:10. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Перекрестная реактивность с яйцами глист и другими паразитами.

Результаты микроскопии	Тест RIDASCREEN® Cryptosporidium
Яйца <i>Schistosoma mansoni</i>	Отрицательный
Яйца <i>Taenia solium</i>	Отрицательный
Яйца <i>Trichuris trichiura</i>	Отрицательный
Яйца <i>Ascaris lumbricoides</i>	Отрицательный
Яйца <i>Enterobius vermicularis</i>	Отрицательный
Яйца <i>Hymenolepis nana</i>	Отрицательный
Яйца <i>Ankylostoma duodenale</i>	Отрицательный
Цисты <i>Entamoeba coli</i>	Отрицательный
Цисты <i>Entamoeba hartmanni</i>	Отрицательный
Цисты <i>Iodamoeba butschlii</i>	Отрицательный
Цисты <i>Blastocystis hominis</i>	Отрицательный
Цисты <i>Giardia lamblia</i>	Отрицательный

13.4. Воспроизводимость измерения

Воспроизводимость результатов оценивали в 22 повторных определениях контролей (положительные и отрицательные контроли) и сильно положительных (HPR), средне положительных (MPR) и слабо положительных (LPR) образцов кала, содержащих *Cryptosporidium parvum*. Определяли среднюю оптическую плотность, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5. Воспроизводимость данных внутри одного измерения.

	Сильно положительный	Средне положительный	Слабо положительный	Отрицательный контроль
MW (OD)	1,968	1,089	0,481	0,045
SD	0,132	0,065	0,025	0,002
Коэффициент вариации CV%	6,7	5,9	5,1	4,9

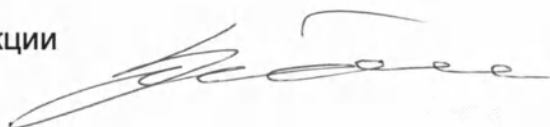
Воспроизводимость результатов между определениями оценивали в 6 опытах в течение 5 дней с использованием 5 различных партий набора реагентов и с использованием описанных выше контролей и образцов. Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6. Воспроизводимость данных между различными измерениями.

	HPR	MPR	LPR	Отрицательный контроль
MW (OD)	2,208	1,222	0,570	0,066
SD	0,068	0,067	0,039	0,005
Коэффициент вариации CV%	3,08	5,49	6,89	7,75

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»М.И. Прищепа
ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения энтамеба гистолитика
(RIDASCREEN® Entamoeba)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Entamoeba

Иммуноферментный тест для качественного определения *Entamoeba histolytica sensu lato* в образцах кала человека.

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест RIDASCREEN® Entamoeba – диагностическая тест-система *in vitro* для выявления *Entamoeba histolytica sensu lato* в образцах кала.

2. ВВЕДЕНИЕ

В целом заражению *Entamoeba histolytica sensu lato* подвергаются ежегодно до 500 миллионов человек. Молекулярно-генетические исследования показали, что простейшее *Entamoeba histolytica* (дизентерийная амеба), идентифицированное обычными диагностическими методами, включает два морфологически неотличимых вида: патогенный *Entamoeba histolytica sensu lato* и, согласно современному уровню знаний, непатогенный *Entamoeba dispar*. Около 90% инфекций *Entamoeba* вызвано *E. dispar*. Но именно *E. histolytica* является причиной заболевания амебными колитами и абсцессами печени 40 – 50 миллионов людей, причем 80000 – со смертельным исходом.

Жизненный цикл энтамебы относительно прост. Инфекция попадает в организм человека через рот при проглатывании четырехядерных цист. Из этих цист в тонком кишечнике развивается одноклеточная вегетативная форма паразита. Этот трофозоит (мелкая форма) размножается и дифференцируется главным образом в толстом кишечнике. Принято считать, что инцистирование запускается под воздействием среды нижней части толстого кишечника. Трофозоиты, помимо цист, обнаруживаются в кале лишь в том случае, если он быстро проходит по кишечному тракту.

Клинические симптомы амебиаза появляются при проникновении паразитов из полости кишечника в слизистую оболочку мембраны толстой кишки. Здесь часто обнаруживаются трофозоиты с фагоцитированными эритроцитами. Благодаря своим размерам эти трофозоиты описаны как большая форма. В результате инвазии амебы в слизистую оболочку кишки развиваются диарея, дизентерия и даже амебиаз. Если произошло расселение амебы, могут возникнуть дальнейшие осложнения: абсцессы печени, легких или даже, в редких случаях, мозга. При отсутствии лечения это может привести к гибели человека.

Клинические симптомы острой кишечной формы амебиаза – спазмы кишечника с тошнотой и частыми поносами с кровью и слизью в кале. Острая стадия заболевания может перерасти в хроническую с редкими поносами, чередующимися с запорами, болями в области живота, тошнотой и рвотой. Описаны также случаи отсутствия симптомов у зараженных людей, несмотря на секрецию цист.

Примерно у 10% людей с острой амебной дизентерией развиваются внекишечные осложнения, такие как абсцесс легких или заболевания других органов. В случае внекишечного амебиаза необходимо серологическое определение антител.

С развитием техники микроскопии, позволившей выявлять цисты и трофозоиты в кале, стала возможной диагностика кишечного амебиаза. Поскольку плотность паразитов может быть очень мала, считается, что чувствительность этого метода при исследовании одного образца кала, даже если анализ проводит очень опытный персонал, около 75%. К тому же существует опасность спутать энтамебу с эпителиальными клетками кишечника, гранулоцитами, макрофагами и грибами.

Значительный прогресс может быть достигнут с внедрением чувствительных иммунологических методов исследования, таких как иммуноферментный анализ (ИФА), использующих специфические антитела к антигенам *Entamoeba*. Таким образом, диагностика становится независимой от субъективных оценок и

более чувствительной, поскольку идентификация больше не основывается на морфологических признаках. Выработка антител вызывается только инвазивной формой энтамебы. Так как титр антител обычно становится определяемым с появлением первых клинических симптомов, для идентификации *Entamoeba histolytica* можно использовать тест на выявление специфичных антител. К тому же, это позволяет проводить дифференциацию между кишечной и внекишечной формами амебиаза в зависимости от высоты титра, что существенно для выбора метода лечения.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Entamoeba основан на твердофазном «сэндвич» методе иммуноферментного анализа (ИФА). На поверхности лунок планшета сорбированы специфичные антитела к антигенам *Entamoeba histolytica sensu lato*.

В лунки вносят разведенные образцы кала и контроли. Добавляют конъюгат антител к антигенам *E. histolytica sensu lato* с пероксидазой из корня хрена и инкубируют при комнатной температуре (20-25 °C).

В результате одновременной инкубации образуется «сэндвич», в котором антиген *Entamoeba* оказывается между антителами твердой фазы и антителами, мечеными ферментом.

Затем лунки отмывают для удаления несвязавшихся меченых ферментом антител. В лунки добавляют субстрат. Если результат теста положительный, фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат в голубую жидкость. Добавление стоп-реагента меняет ее цвет на желтый. Оптическую плотность измеряют при длине волны 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 600 нм). Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антигена *E. histolytica sensu lato* в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет 96-луночный: в рамке-держателе, разделяемый на двенадцать 8-луночных стрипов, покрытых иммобилизованными специфичными антителами к антигенам <i>E. histolytica sensu lato</i> ; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 лунок
Diluent	Раствор для разведения образцов: забуференный белковый раствор NaCl; содержит 0,1% Kathon; синего цвета; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash	Промывочный буфер: 10x концентрат; фосфатный буферный раствор с NaCl; содержит 0,1% тимерозал (мертиолят)	1 x 100 мл
Control +	Положительный контроль: инактивированные <i>E. histolytica sensu lato</i> ; содержит 0,1% Kathon; готов к использованию	1 x 1,8 мл
Conjugate	Конъюгат фермента: антитела к <i>E. histolytica sensu lato</i> , конъюгированные с пероксидазой хрена; в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,05% проклин 300; синего цвета; готов к использованию	1 x 10 мл
Substrate	Субстратный раствор: пероксид мочевины / ТМБ; готов к использованию	1 x 10 мл
Stop	Стоп-реагент: 1N раствор серной кислоты; готов к использованию	1 x 6 мл
	Инструкция по применению	

5. Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Пробирки для разведения образцов.
- Одноразовые пипетки для образцов кала (кат. № Z0001)
- Вортекс (необязательно, см. п. 9.3).
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 50 - 100 мкл и 1 мл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Таймер
- Устройство для промывки планшетов или многоканальные пипетки (300 мкл)
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, при необходимости референтный фильтр с длиной волны ≥ 600 нм)
- Фильтровальная бумага
- Контейнер для отработанных материалов, содержащий 0,5% раствор гипохлорита

6. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Промывочный буфер после разведения следует хранить при 2-8 °C и использовать максимум в течение 4

недель. Следует избегать микробной контаминации. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Перед использованием все реагенты и стрипы должны быть доведены до комнатной температуры (20-25 °C). Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов, не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной (20-25 °C). Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застежку. Неиспользованные стрипы немедленно вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °C.

Субстрат бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел голубую окраску, он становится непригодным для использования.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Положительный контроль содержит инаktivированные антигены *Entamoeba*. Однако, как контроль, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Не следует пипетировать ртом образцы или реагенты, необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Положительный контроль и раствор для разведения образцов содержат 0,1% Kathon в качестве консерванта. Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
- Конъюгат фермента содержит 0,05% проклин 300 в качестве консерванта. Следует избегать его контакта с кожей или слизистыми.
- Промывочный буфер содержит 0,1% тимерозал (мертиолят) в качестве консерванта. Следует избегать его контакта с кожей или слизистыми.
- Пероксид мочевины может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 1N серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C, по меньшей мере, в течение одного часа.
- **ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Образцы кала до анализа следует хранить при температуре 2-8 °C. Если нет возможности провести исследование в течение 3 дней, образцы рекомендуется заморозить и хранить при температуре минус 20 °C и ниже. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Не помещайте образцы кала и ректальные мазки в емкости, содержащие транспортировочные среды с консервантами, сыворотками крови животных, ионами металлов, окислителями или детергентами, поскольку все они могут влиять на результаты анализа RIDASCREEN® Entamoeba.

При использовании ректальных мазков проследите, чтобы образец содержал необходимое для проведения теста количество кала (около 100 мг). При мониторинге следует также отбирать образцы кала у всех, бывших в контакте с пациентом, но не имеющих клинических симптомов, для выявления асимптоматических носителей.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите все реагенты и стрипы [Plate] до комнатной температуры (20 – 25°C). Не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока их температура не достигнет комнатной. Тщательно перемешайте реагенты непосредственно перед использованием. После вскрытия стрипы (в запечатанном пакете) и реагенты необходимо хранить при 2-8 °C. Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы. Для предотвращения перекрестной контаминации необходимо предохранять образцы от контакта с компонентами набора. Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время анализа. Для

предотвращения испарения реагентов рекомендуется при инкубациях закрывать планшет со стрипами крышкой или пленкой.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера **Wash** смешать с 9 частями дистиллированной воды. Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37°C. Готовый буфер можно хранить в течение 4 недель при температуре 2-8 °C.

9.3. Подготовка образцов

Образцы кала разведите **1:11** (по объему) с помощью RIDASCREEN® буфера для разведения образцов кала следующим образом: внесите 1 мл RIDASCREEN® буфера для разведения образцов **Diluent** в промаркированную пробирку. Наберите около 100 мкл жидкого кала в одноразовую пипетку для образцов кала (кат. № Z0001) до второго утолщения и разведите в 1 мл буфера для разведения образцов. Если кал твердый, возьмите эквивалентное количество (размером с горошину, около 50-100 мг) шпателем или одноразовой инокуляционной петлей и разведите его в растворе. Измельчите образец, набирая и выпуская суспензию кала в буфере пипеткой или тщательно размешивая его на вортексе. После кратковременного отстаивания надосадочную жидкость суспензии кала можно непосредственно использовать в анализе. При применении автоматического ИФА анализатора **необходимо** использовать надосадочную жидкость без примеси частиц. Для этого образец следует отцентрифугировать при 5000 об/мин (около 2300 – 2500 g) в течение примерно 5 минут.

Ректальные мазки перемешивают в 1 мл буфера для разведения образцов кала, периодически отжимая тампон о стенку пробирки. После тщательного перемешивания суспензию используют в анализе.

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по **2 капли (или 100 мкл)** положительного контроля **Control +**, или отрицательного контроля (буфера для разведения образцов **Diluent**), или разведенного образца кала. В каждую лунку добавьте по **2 капли (или 100 мкл)** конъюгата фермента с антителами **Conjugate**. Тщательно перемешивайте содержимое лунок осторожными круговыми движениями планшета по поверхности стола. Инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) в течение **60 минут**.

9.5. Промывка

Тщательная промывка необходима для получения правильных результатов. Она должна выполняться строго по инструкции. Вылейте или отсосите содержимое лунок в контейнер для отходов с дезинфицирующим раствором (гипохлоритом). Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Внесите по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку, после чего удалите жидкость из лунок. Повторите цикл промывки 4 раза (всего 5 промывок). После каждого цикла промывки удаляйте остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о сухую, не использованную ранее фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для планшетов следует убедиться, что оно подходит для данного типа планшетов. Помимо этого, если в суспензии кала оставались частички, необходимо удалить их из лунок вручную центрифугированием до проведения первого цикла промывки. Это позволит избежать засорения игл промывочного устройства. Следите за тем, чтобы промывочное устройство целиком заполняло ячейки жидкостью и полностью удаляло ее. После последнего цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Для достижения оптимальной промывки рекомендуется использовать режим переполнения (по меньшей мере 600 мкл промывочного буфера на лунку). Если число промывок будет превышать 5, это улучшит результат промывки.

9.6. Вторая инкубация

Внесите в каждую лунку по **2 капли** субстрата **Substrate**. Инкубируйте в течение **15 минут** при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте.

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по **1 капле (50 мкл)** стоп-реагента **Stop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 600 нм) против бланка по воздуху (т.е. без планшета).

Примечание:

При очень высокой концентрации антигенов энтамебы в образце пациента в лунках с субстратом может образовываться темный осадок.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Доведите все реагенты до комнатной температуры.
2. Приготовьте промывочный буфер.
3. Приготовьте суспензию кала.
4. Внесите в лунки по **100 мкл (2 капли)** разведенного образца, или положительного контроля, или отрицательного контроля.
5. Добавьте по **2 капли** конъюгата фермента; инкубируйте в течение **60 минут** при комнатной температуре.
6. Удалите содержимое лунок и промойте 5 раз, внося по **300 мкл** промывочного буфера в каждую лунку.
7. Внесите по **2 капли** субстрата; инкубируйте в течение **15 минут** при комнатной температуре в темноте.
8. Добавьте **1 каплю** стоп-реагента, измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества положительный и отрицательный контроли должны включаться в каждую серию определений, поскольку это позволяет убедиться в стабильности используемых реагентов и правильной постановке анализа. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность (ОП) отрицательного контроля ниже 0,2 и оптическая плотность положительного контроля выше 0,8 при длине волны 450 нм. Если оптическая плотность отрицательного контроля выше 0,2, это может свидетельствовать о недостаточной отмывке. Если значения контролей не соответствуют предъявляемым требованиям или субстрат помутнел или окрасился в голубой цвет до внесения в лунки, это может свидетельствовать об истечении срока годности реагентов. Пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ

11.1. Расчет уровня отсечения (cut-off)

Уровень отсечения (cut-off) рассчитывают, прибавляя 0,15 единиц оптической плотности к измеренной оптической плотности отрицательного контроля.

$$\text{cut-off} = \text{оптическая плотность отрицательного контроля} + 0,15$$

11.2. Интерпретация результатов

Образцы считаются **положительными**, если их оптическая плотность **выше** порогового уровня отсечения более чем на 10%.

Образцы, значение оптической плотности которых выше или ниже уровня отсечения в пределах 10% ($\pm 10\%$), нельзя считать четко положительными или четко отрицательными. Результат следует считать **неопределенным** (серая зона). Рекомендуется протестировать эти образцы повторно. Если при повторном анализе свежесобранного образца кала результат снова окажется неопределенным, образец следует считать отрицательным.

Образцы считаются **отрицательными**, если их оптическая плотность **ниже** порогового уровня отсечения более чем на 10%.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система RIDASCREEN® Entamoeba выявляет антигены *E. histolytica sensu lato* в образцах кала. Тест не может быть использован для установления зависимости между значениями оптической плотности и выраженностью клинической картины. **Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клиническим диагнозом.**

Положительный результат на *E. histolytica sensu lato* не исключает присутствия в образце других патогенных микроорганизмов.

Отрицательный результат в целом не исключает возможности амебиаза. Это может быть вызвано прерывистой экскрецией патогена или недостаточным для определения количеством антигенов в образце.

Невыявление антигена в кале особенно касается случаев инвазивного амебиаза. Если у пациента анемия или имеется обоснованное подозрение на наличие инфекции *E. histolytica*, следует провести анализ другого образца кала этого пациента через четыре недели.

Подозрение на внекишечную форму амебиаза может быть подтверждено определением в сыворотке крови специфических антител к *E. histolytica* (с помощью набора RIDASCREEN® Entamoeba histolytica IgG, кат. № K1721).

Неопределенный результат может быть связан с неравномерным распределением антигенов *E. histolytica* в образце кала. В этом случае следует выполнить анализ другой суспензии того же образца кала или анализ другого образца кала.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Клинические исследования

Клинические исследования тест-системы RIDASCREEN® Entamoeba проводили на 276 образцах кала. Образцы были взяты у пациентов из Германии, вернувшихся из-за границы в период между сентябрем 1999 и мартом 2000 годов. Эти пациенты обращались в клинику инфекционных болезней и тропической медицины в Мюнхене с различными жалобами. Все образцы исследовали на наличие яиц паразитических червей, а также других паразитических организмов с помощью прямой микроскопии железогематоксилиновым методом и методом с использованием SAF-обогащения. Каждый препарат исследовали два опытных специалиста в течение 10 минут. Аликвоты свежеобработанных образцов кала сразу после взятия замораживали при температуре минус 20°C. После размораживания образцы исследовали с помощью иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией производителя. Не было обнаружено перекрестных реакций с другими паразитическими организмами кишечной флоры. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты исследования тест-системой RIDASCREEN® Entamoeba и с помощью традиционной микроскопии.

		Микроскопия	
RIDASCREEN® Entamoeba		положительный	отрицательный
	положительный	9	2
	отрицательный	2	263

Чувствительность	81,8%
Специфичность	99,2%
Положительные прогнозируемые значения	81,8%
Отрицательные прогнозируемые значения	99,2%

13.2. Перекрестная реактивность с патогенными микроорганизмами

Специфичность тест-системы RIDASCREEN® Entamoeba исследовали, проводя анализ с различными патогенными микроорганизмами кишечной микрофлоры и другими организмами, случайно присутствующими в кале. Исследовали бактерии, представленные в виде изолятов или DSM-штаммов после ночной инкубации в ВНИ-среде, содержащей суспензию с концентрацией $10^6 - 10^8$ микроорганизмов в мл. Анализ проводили в дубликатах. Оптическую плотность измеряли при 450 нм. Перекрестная реактивность не выявлена. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Перекрестная реактивность с патогенными микроорганизмами.

Исследованный микроорганизм	Источник	Результат	Суспензия
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	DSM 2403	отрицательный	0,003
<i>Aeromonas hydroph. anaerogenes</i>	DSM 30188	отрицательный	0,003
<i>Aeromonas hydroph. hydrophila</i>	DSM 30016	отрицательный	0,005
<i>Citrob. freundii</i> LI*	изолят	отрицательный	0,005
<i>Citrob. freundii</i>	DSM 30039	отрицательный	0,005
<i>Enterob. cloacae</i>	DSM 30054	отрицательный	0,004
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	отрицательный	0,001
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 27164	отрицательный	0,003
<i>E. coli</i> LI*	изолят	отрицательный	0,005
<i>E. coli</i> LI*	изолят	отрицательный	0,006
<i>E. hermanii</i>	DSM 4560	отрицательный	0,007
<i>Pseudom. aeruginosa</i>	DSM 939	отрицательный	0,015
<i>Pseudom. fluorescens</i>	DSM 4358	отрицательный	0,000
<i>Pseudom. fluorescens</i>	DSM 50124	отрицательный	0,001
<i>Salmonella agona</i> LI*	изолят	отрицательный	0,006
<i>Salmonella braenderup</i> LI*	изолят	отрицательный	0,005
<i>Salmonella infantis</i> LI*	изолят	отрицательный	0,008
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 20481	отрицательный	0,005
<i>Listeria innocua</i> 6a, LI*	изолят	отрицательный	0,012
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788	отрицательный	0,007
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479	отрицательный	0,011
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 30119	отрицательный	0,007
<i>Providencia stuartii</i>	DSM 6676	отрицательный	0,002
<i>Salmonella Ohio</i> LI*	изолят	отрицательный	0,003
<i>Salmonella typhimurium</i> LI*	изолят	отрицательный	0,006
<i>Serratia proteamaculans</i>	DSM 4487	отрицательный	0,007
<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782	отрицательный	0,013
<i>Shigella sonnei</i>	DSM 5570	отрицательный	0,008
<i>Staph. aureus</i>	DSM 20372	отрицательный	0,006
<i>Staph. aureus</i> LI*	изолят	отрицательный	0,006
<i>Strep. agalactiae</i> LI*	изолят	отрицательный	0,004
<i>Strep. dysgalactiae</i> LI*	изолят	отрицательный	0,001
<i>Strep. uberis</i> LI*	изолят	отрицательный	0,001
<i>E. coli</i> O22:H8, VT1	изолят	отрицательный	0,010
<i>E. coli</i> O157:H7 VT1+2	изолят	отрицательный	0,016
Отрицательный контроль (USP)			0,003
Положительный контроль (набор)			1,327
Уровень отсечения (cut-off)			0,153
	Источник	Результат	Суспензия
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	отрицательный	0,098
<i>Salmonella enteritis</i>	DSM 9898	отрицательный	0,0062
<i>Campilobacter jejuni</i>	DSM 4688	отрицательный	0,122
<i>Campilobacter coli</i>	DSM 4689	отрицательный	0,243
<i>Campilobacter fetus</i>	DSM 5361	отрицательный	0,24
<i>Morganella morganii</i>	DSM 6675	отрицательный	0,138
Положительный контроль			2,626
Отрицательный контроль			0,001
Уровень отсечения (cut-off)			0,151

* Изолят

13.3. Перекрестная реактивность с яйцами паразитических червей и с другими паразитическими организмами

С помощью тест-системы RIDASCREEN® Entamoeba исследовали образцы кала с обнаруженными в них при микроскопии паразитическими организмами. В иммуноферментном анализе использовали разведение образцов 1:10. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Перекрестная реактивность с яйцами паразитических червей и с другими паразитическими организмами.

Результат микроскопии	RIDASCREEN® Entamoeba (уровень отсечения (cut-off): отрицательный контроль + 0,150)
Яйца <i>Schistosoma mansoni</i>	отрицательный
Яйца <i>Taenia solium</i>	отрицательный
Яйца <i>Trichuris trichiura</i>	отрицательный
Яйца <i>Ascaris lumbricoides</i>	отрицательный
Яйца <i>Enterobius vermicularis</i>	отрицательный
Яйца <i>Hymenolepis nana</i>	отрицательный
Яйца <i>Ankylostoma duodenale</i>	отрицательный
Цисты <i>Entamoeba coli</i>	отрицательный
Цисты <i>Entamoeba hartmanni</i>	отрицательный
Цисты <i>Iodamoeba bütschlii</i>	отрицательный
Цисты <i>Blastocystis hominis</i>	отрицательный
Цисты <i>Giardia lamblia</i>	отрицательный
Цисты <i>Cryptosporidia</i>	отрицательный

13.4. Точность

Воспроизводимость внутри опыта оценивали, анализируя 4 образца кала с различными концентрациями антигена *E. histolytica* в 24 повторях, используя набор одной и той же серии. Определяли среднюю оптическую плотность, стандартное отклонение и коэффициент вариации.

Воспроизводимость между опытами оценивали, анализируя 4 образца кала с различными концентрациями антигена *E. histolytica* в 21 независимом повторе (3 лаборанта на протяжении 7 дней). Определяли среднюю оптическую плотность, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Воспроизводимость набора RIDASCREEN® Entamoeba.

	Отрицательный	Слабо-положительный	Сильно-положительный	Положительный контроль
<u>Воспроизводимость внутри опыта:</u>				
Средняя оптическая плотность	0,06	0,72	1,87	2,90
Стандартное отклонение	0,008	0,036	0,114	0,139
Коэффициент вариации (%)	13,25	5,15	6,39	4,75
<u>Воспроизводимость между опытами:</u>				
Средняя оптическая плотность	0,057	0,75	1,937	3,009
Стандартное отклонение	0,006	0,115	0,197	0,136
Коэффициент вариации (%)	10,13	15,34	10,16	4,51

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции

К.И. Бланк

ЛИСТОВ.

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения IgG антител к энтамеба гистолитика
(RIDASCREEN® *Entamoeba histolytica* IgG)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® *Entamoeba histolytica* IgG

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgG к *Entamoeba histolytica* в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

RIDASCREEN® *Entamoeba histolytica* IgG является иммуноферментной тест-системой для выявления специфических антител класса IgG к *Entamoeba histolytica* (дизентерийной амебе) в сыворотке крови человека. Только для *in vitro* диагностики.

2. ВВЕДЕНИЕ

В результате инфекции *E. histolytica* происходит формирование специфических антител к патогену, определение которых в сыворотке крови возможно с помощью иммунологических методов. Выбор метода и определяемых патоген-специфичных антител имеет важное значение для диагностики. По сравнению с другими серологическими методами (например, РСК) ИФА является более чувствительным и специфичным методом диагностики.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител класса IgG к *Entamoeba* основано на двухстадийном непрямом иммуноферментном анализе. Специфические антигены *Entamoeba histolytica* сорбированы на поверхности лунок микропланшета. В лунки вносят разведенные образцы сыворотки крови и контроли и инкубируют при комнатной температуре. Имеющиеся в них антитела к *Entamoeba* связываются с иммобилизованными антигенами. Не связавшиеся антитела удаляются промывкой. На второй стадии в лунки вносят конъюгированный с пероксидазой белок А. После инкубации не связавшийся конъюгат удаляется промывкой. В лунки добавляют субстрат (перекись мочевины) и хромоген (ТМБ) и инкубируют при комнатной температуре. Фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат/хромоген в голубую жидкость. Добавление стоп-реагента меняет ее цвет на желтый. Оптическую плотность измеряют при длине волны 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет 96-луночный: в рамке-держателе, состоящий из двенадцати 8-луночных стрипов с отделяемыми лунками, покрытых инактивированным антигеном <i>Entamoeba histolytica</i> ; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
Diluent бесцветная крышка	Буфер для разведения образцов: фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,1% Kathon CG и 0,1% Твин 20; желтого цвета; готов к использованию	1 × 100 мл
Wash коричневая крышка	Промывочный буфер: 20х концентрат; фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,5% Kathon CG, 1,5% Твин 20	1 × 50 мл
Control + красная крышка	Положительный контроль: инактивированная человеческая сыворотка, содержащая антитела класса IgG; содержит 0,1% Kathon CG; готов к использованию	1 × 1,2 мл
Control – бесцветная крышка	Отрицательный контроль: инактивированная человеческая сыворотка, не содержащая антител класса IgG; содержит 0,1% Kathon CG и 0,1% Твин 20; готов к использованию	1 × 2,5 мл
Conjugate оранжевая крышка	Конъюгат белка А: конъюгированный с пероксидазой хрена белок А в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,01% метилизотиазолинон, 0,01% бромонитродидоксан, проклин; готов к использованию	1 × 12 мл
Substrate зеленая крышка	Субстратный раствор: тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 × 6 мл
Chromogen голубая крышка	Хромоген: пероксид мочевины; готов к использованию	1 × 6 мл
Stop желтая крышка	Стоп-реагент: 0,5 М раствор серной кислоты	1 × 6 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Следует избегать микробной контаминации. Качество набора гарантируется только до истечения его срока годности. Разведенный промывочный буфер можно хранить при температуре 2-8 °С не более четырех недель. После окончания срока годности качество реагентов не гарантируется.

Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застежку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните при температуре 2-8 °С.

Хромоген бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если хромоген приобрел голубую окраску, он становится непригодным.

6. Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Пробирки для разведения образцов
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 10 – 100 мкл и 100 – 1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, оптимальная референтная длина волны ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага
- Контейнер для утилизации отходов с 0,5% раствором гипохлорита натрия

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Не следует пипетировать ртом образцы или реагенты, необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Контрольные сыворотки (положительный и отрицательный контроль) были проверены на антитела к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на наличие антигена гепатита В, и при этом показали отрицательные результаты. Однако, как контроли, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Положительный и отрицательный контроли и раствор для разведения образцов содержат катон CG в качестве консерванта. Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
- Пероксид мочевины может вызвать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121°C, по меньшей мере, в течение одного часа.
- **ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоты, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

ИФА тест RIDASCREEN® Entamoeba histolytica IgG предназначен для исследования образцов сыворотки крови человека.

После взятия крови необходимо как можно скорее отделить сгусток во избежание гемолиза. Образцы следует хранить в холодильнике или в замороженном виде до момента исследования. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, подвергшихся тепловой обработке, липемических, гемолизированных, иктеричных и мутных образцов может привести к получению неверных результатов.

Таблица 1. Хранение образцов.

Неразбавленная сыворотка		Разбавленная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	больше одной недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите все реагенты и стрипы до комнатной температуры в течение не менее 30 минут. Не извлекайте стрипы из упаковки до того, как они прогреются до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Сразу после использования набор необходимо поместить на хранение при температуре 2-8°C.

Отбирайте только необходимое для анализа количество реагентов. Не выливайте оставшиеся реагенты обратно во флаконы чтобы не допустить контаминации.

Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы.

Промывочный буфер, буфер для разведения образцов и раствор субстрата/хромогена не являются специфичными и могут быть использованы для постановки других тестов RIDASCREEN® для определения антител к паразитам.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Разведите концентрат промывочного буфера дистиллированной водой в соотношении 1:20 (1 часть концентрата на 19 частей дистиллированной воды). Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C.

Внесите 50 мл концентрированного промывочного буфера в мерный цилиндр объемом 1000 мл. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой. Готовый промывочный буфер можно хранить при температуре 2-8 °C не более 4 недель.

9.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите образцы сыворотки крови буфером для разведения образцов в соотношении 1:50, например, следующим образом:

10 мкл образца сыворотки крови + 490 мкл буфера для разведения образцов

Внимание! Контроли, входящие в состав набора, готовы к использованию и не требуют разведения.

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 100 мкл положительного контроля, отрицательного контроля или разведенных образцов сыворотки. Инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) в течение **15 минут**. В каждом анализе рекомендуется отводить для отрицательного контроля по 2 лунки.

9.5. Промывка

Вылейте или удалите аспирацией содержимое лунок в пустой контейнер с дезинфицирующим раствором. Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Затем промойте все лунки 5 раз, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. После каждого цикла промывки удаляйте остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следите за тем, чтобы промывочное устройство подходило для планшетов этого типа.

9.6. Вторая инкубация

В каждую лунку внесите по 100 мкл (или 2 капли) конъюгата. Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25 °C) в течение **15 минут**.

9.7. Промывка

Промойте планшет 5 раз как описано выше в пункте 9.5.

9.8. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 50 мкл (или 1 капле) субстрата и по 50 мкл (или 1 капле) хромогена. Инкубируйте планшет в течение **15 минут** при комнатной температуре (20-25 °C).

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл (или 1 капле) стоп-реагента. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измерьте оптическую плотность в лунках с помощью планшетного спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для контроля качества положительный и отрицательный (в дубликатах) контроли должны включаться в каждую серию определений. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность (ОП) положительного контроля при 450 нм выше 0,8. Средняя оптическая плотность отрицательного контроля при 450 нм должна быть ниже 0,3. Если результаты отдельных измерений отрицательного контроля отличаются от средней оптической плотности более чем на 25%, тест следует повторить. Если полученные значения отличаются от указанных, если хромоген помутнел или приобрел голубую окраску до внесения в лунки стрипов, можно предположить, что срок годности реагентов истек.

Пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дистрибьютеру.

11. РАСЧЕТ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Расчет индекса пробы

1. Рассчитайте среднюю ОП отрицательного контроля.
2. Прибавьте 0,150 к средней ОП. Полученный результат является cut-off (уровнем отсечения) анализа.
3. Рассчитайте индекс пробы, разделив ОП образца на значение cut-off, полученное в пункте 1.

Пример:

отрицательный контроль (1 лунка)	ОП = 0,115
отрицательный контроль (2 лунка)	ОП = 0,125
образец	ОП = 0,508

$$\text{значение cut-off} = \frac{0,115 + 0,125}{2} + 0,150 = 0,270$$

$$\text{индекс пробы} = \frac{0,508^2}{0,270} = 1,88$$

11.2. Интерпретация результатов

Таблица 2. Расчет индекса пробы.

	отрицательный	неопределенный	положительный
Индекс пробы	< 0,9	0,9 – 1,1	> 1,1

11. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Иммуноферментный тест RIDASCREEN® Entamoeba histolytica IgG выявляет специфические антитела к *Entamoeba histolytica*. Тест используют в случаях подозрения на амебиаз. При постановке диагноза, наряду с результатами теста, следует принимать во внимание всю совокупность клинических данных.

Результаты теста зависят от локализации паразита и могут различаться у разных пациентов.

В совокупности с положительным результатом на наличие антигенов амев в кале, положительный анализ на антитела позволяет утверждать, что именно *Entamoeba histolytica sensu stricto* является причиной появления клинических симптомов.

В случае внекишечной формы амебиаза положительный результат определения антител может помочь идентифицировать амебиаз, даже если анализ кала на *Entamoeba histolytica* отрицательный. Выявление антител должно быть подтверждено клиническими данными и другими методами диагностики.

Отрицательный результат не исключает инфицирования *Entamoeba*. Из-за низкого титра антител на начальной стадии заболевания, результат теста, проведенного в этот период, может быть отрицательным или неопределенным. Если на основании клинических данных имеется подозрение на наличие амебной инфекции, следует провести анализ другого образца сыворотки этого пациента через несколько дней.

Положительный результат на наличие антител к *Entamoeba histolytica* не исключает присутствия в образце других патогенных микроорганизмов.

12. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Вариации между постановками n=5	IgG	
	ОП	CV
Сыворотка 1	0,233	6,3%
Сыворотка 2	0,456	5,9%
Сыворотка 3	1,448	4,1%

Вариации внутри постановки n=24	IgG	
	ОП	CV
Сыворотка 1	0,175	6,4%
Сыворотка 2	0,688	3,4%
Сыворотка 3	1,495	4,4%

Чувствительность и специфичность теста для антител класса IgG в сравнении с двумя другими коммерчески доступными наборами ИФА:

Чувствительность 100,0%

Специфичность 95,6%

Результат анализа 200 образцов сывороток от доноров (донорский центр, Германия):

	отрицательный	неопределенный	положительный
200 образцов сывороток крови от доноров	99%	1%	0%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 3 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения лямблий
(RIDASCREEN® Giardia)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Giardia

Иммуноферментный тест для качественного определения антигена *Giardia lamblia* в образцах кала

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного определения антигена *Giardia lamblia* в образцах кала в целях диагностики лямблиоза.

2. ВВЕДЕНИЕ

Giardia lamblia – жгутиковое простейшее, вызывающее после проглатывания цист поражение тонкого кишечника. Из-за повсеместного распространения этот организм стал считаться одной из основных причин хронической диареи, а также диареи путешественников. Заражение происходит при заглатывании цист *Giardia lamblia* с водой или пищей, загрязненными фекалиями. В Соединенных Штатах *Giardia lamblia* – наиболее часто выявляемый возбудитель во время вспышек диареи, обусловленных загрязненной водой. В развивающихся странах *Giardia* являются одной из наиболее частых причин заболеваемости у детей младше 10 лет, с частотой заболеваемости около 15-20%. Обычно лямблиозы распространены в слоях населения с низким уровнем личной гигиены и передаются орально-фекальным путем. Этот путь передачи наблюдают среди детей в центрах медицинской помощи, среди сексуально активных мужчин-гомосексуалистов (до 19%), а также среди людей, живущих в учреждениях закрытого типа (больница, тюрьма). Заболевание также может передаваться от детей их родителям. У инфицированных детей более старшего возраста заболевание может протекать бессимптомно, при этом они выделяют во внешнюю среду цисты и могут служить источником заражения других людей.

Лямблиоз характеризуется острой или хронической диареей, также может отмечаться асимптоматическая элиминация цист. Инкубационный период составляет от 3 до 42 дней. При острой инфекции наблюдается внезапное начало водянистого кала (частая дефекация, желтоватый, пенистый с неприятным запахом кал и флатуленция), потеря аппетита, рвота, угнетение и снижение веса; кровь, гной и слизь в кале обычно отсутствуют.

В прошлом для диагностики лямблиоза чаще всего проводили исследование кала на наличие трофозоитов или цист с помощью микроскопии, которая требует наличие квалифицированного персонала. Кроме того, исследование необходимо проводить длительное время из-за периодического выделения паразита.

Альтернативный метод диагностики – новый иммуноферментный тест для обнаружения антигенов *Giardia lamblia* в образцах кала. Метод демонстрирует ту же чувствительность, что и микроскопия, не нуждается в опытном лабораторном персонале микробиологов, он легок в исполнении и не требует много времени и не нуждается в том, чтобы в образцах кала присутствовали интактные организмы (трофозоиты или цисты).

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Giardia основан на методе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) по типу «сэндвич». На поверхность лунок микропланшета адсорбируют моноклональные антитела к белкам клеточной стенки (CWP) цист *Giardia lamblia* или трофозоитов. В лунки вносят разведенные образцы кала и контроли. Добавляют другие моноклональные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, и инкубируют при комнатной температуре.

В результате инкубации образуется сэндвич-комплекс, в котором антигены *Giardia lamblia* находятся между твердой фазой лунок и антителами, конъюгированными с пероксидазой. Несвязавшийся ферментный конъюгат удаляют промыванием.

В лунки вносят субстрат/хромоген и инкубируют при комнатной температуре. Фермент, связавшийся с лунками, превращает бесцветный субстрат в продукт, окрашенный в синий цвет. Добавление стоп-реагента меняет окраску с синей на желтую. Затем измеряют поглощение при 450 нм (по возможности используют длину волны сравнения ≥ 600 нм). Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству антигена, присутствующего в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет 96-луночный: в рамке-держателе, состоящий из двенадцати 8-луночных стрипов с разделяемыми лунками, покрытых адсорбированными мышинными моноклональными антителами к <i>Giardia lamblia</i> ; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
Diluent 1	Раствор для разведения образцов: забуференный белковый раствор NaCl; содержит 0,1% Kathon; синего цвета; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash	Промывочный буфер: 10x концентрат; фосфатный буферный раствор с NaCl; содержит 0,1% тимерозал (мертиолят)	1 x 100 мл
Control +	Положительный контроль: инактивированный антиген <i>Giardia lamblia</i> ; готов к использованию	1 x 1,8 мл
Conjugate	Конъюгат фермента: антитела к <i>Giardia lamblia</i> , конъюгированные с пероксидазой хрена; в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,1% Kathon; зеленого цвета; готов к использованию	1 x 10 мл
Substrate	Субстратный раствор: пероксид мочевины / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 10 мл
Stop	Стоп-реагент: 1N раствор серной кислоты; готов к использованию	1 x 6 мл
	Инструкция по применению	

5. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

5.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода.

5.2. Оборудование

- Пробирки для анализа
- Трансфер-пипетки (кат. № Z0001)
- Вортекс
- Микропипетки на объем от 100 мкл до 1 мл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Таймер
- Промывочное устройство для микропланшетов или многоканальная пипетка (300 мкл)
- Фотометр (ИФА ридер) (450 нм, дополнительная длина волны сравнения ≥ 600 нм)
- Фильтровальная (или любая другая впитывающая бумага, например, бумажные полотенца)
- Контейнер для утилизации отходов с 0,5% раствором гипохлорита

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Положительный контроль содержит инактивированный антиген *Giardia*. Однако, как контроль, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Не пипетируйте ртом образцы или реагенты; необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Раствор для разведения образцов и конъюгат фермента содержат 0,1% катон в качестве консерванта. Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.

- Промывочный буфер содержит 0,1% тимеросал в качестве консерванта. Следует избегать его контакта с кожей или слизистыми.
- Пероксид мочевины может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 1N серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121°C, по меньшей мере, в течение одного часа.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

7. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать только до истечения срока годности, указанного на этикетках флаконов. Необходимо исключить микробное загрязнение. Гарантийные обязательства при несоответствии качества набора не удовлетворяются после истечения срока его годности.

Разведенный промывочный буфер сохраняется в течение 4 недель при хранении при 2-8 °C.

Перед использованием прогрейте реагенты и микропланшеты при комнатной температуре.

Чтобы избежать увлажнения стрипов, не вынимайте стрипы из пакета до тех пор, пока они не прогреются до комнатной температуры. Пакет из фольги необходимо открывать с помощью ножниц, не повреждая застевку. Уберите неиспользованные стрипы в пакет из фольги, запечатайте пакет и храните его при 2-8 °C. Бесцветный раствор субстрата/хромогена необходимо хранить в защищенном от света месте, чтобы избежать порчи или появления окраски в результате самоокисления. Если субстрат/хромоген приобрел синее окрашивание, этот реагент использовать нельзя.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы кала до анализа следует хранить при температуре 2-8 °C. Если нет возможности провести исследование в течение 3 дней, образцы рекомендуется заморозить и хранить при температуре минус 20 °C и ниже. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Не помещайте образцы кала и ректальные мазки в емкости, содержащие транспортировочные среды с консервантами, сыворотками крови животных, ионами металлов, окислителями или детергентами, поскольку все они могут влиять на результаты анализа RIDASCREEN® Giardia.

При использовании ректальных мазков проследите, чтобы образец содержал необходимое для проведения теста количество кала (около 100 мг). При мониторинге следует также отбирать образцы кала у всех, бывших в контакте с пациентом, но не имеющих клинических симптомов, для выявления асимптоматических носителей.

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1 Общие замечания

Перед использованием доведите все реагенты и стрипы **Plate** до комнатной температуры (20-25 °C). Не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока их температура не достигнет комнатной. Тщательно перемешайте реагенты непосредственно перед использованием. После вскрытия стрипы (в запечатанном пакете) и реагенты необходимо хранить при 2-8 °C. Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы. Для предотвращения перекрестной контаминации необходимо предохранять образцы от контакта с компонентами набора. Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время анализа. Для предотвращения испарения реагентов рекомендуем при инкубациях закрывать планшет со стрипами крышкой или пленкой.

9.2 Приготовление промывочного буфера

Одну часть концентрированного промывочного буфера **Wash** разводят девятью частями дистиллированной воды. Кристаллы в концентрате буфера можно растворить на водяной бане при 37 °C.

9.3 Приготовление образцов

Образцы кала разведите 1:11 (по объему) с помощью RIDASCREEN® буфера для разведения образцов кала следующим образом.

Внесите 1 мл RIDASCREEN® буфера для разведения образцов **Diluent 1** в промаркированную пробирку. Наберите около 100 мкл жидкого кала в одноразовую пипетку для образцов кала (кат. № Z0001) до второго утолщения и разведите в 1 мл буфера для разведения образцов. Если кал твердый, возьмите эквивалентное количество (размером с горошину, около 50-100 мг) шпателем или одноразовой инокуляционной петлей и разведите его в растворе. Измельчите образец, набирая и выпуская суспензию кала в буфере пипеткой или тщательно размешивая его на вортексе. После кратковременного отстаивания надосадочную жидкость суспензии кала можно непосредственно использовать в анализе. При применении

автоматического ИФА анализатора **необходимо** использовать надосадочную жидкость без примеси частиц. Для этого образец следует отцентрифугировать при 5000 об/мин (около 2300 – 2500 g) в течение примерно 5 минут.

Ректальные мазки перемешивают в 1 мл буфера для разведения образцов кала, периодически отжимая тампон о стенку пробирки. После тщательного перемешивания суспензию используют в анализе.

9.4 Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 2 капли (или 100 мкл) положительного контроля **Control +**, или отрицательного контроля (буфера для разведения образцов **Diluent 1**), или разведенного образца кала. В каждую лунку добавьте по 2 капли (или 100 мкл) конъюгата фермента с антителами **Conjugate**. Тщательно перемешайте содержимое лунок осторожными круговыми движениями планшета по поверхности стола. Инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) в течение **60 минут**.

9.5 Промывка

Тщательная промывка необходима для получения правильных результатов. Она должна выполняться строго по инструкции. Вылейте или отсосите содержимое лунок в контейнер для отходов с дезинфицирующим раствором (гипохлоритом). Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Внесите по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку, после чего удалите жидкость из лунок. Повторите цикл промывки 4 раза (всего 5 промывок). После каждого цикла промывки удаляйте остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о сухую, не использованную ранее фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для планшетов следует убедиться, что оно подходит для данного типа планшетов. Помимо этого, если в суспензии кала оставались частички, необходимо удалить их из лунок вручную центрифугированием до проведения первого цикла промывки. Это позволит избежать засорения игл промывочного устройства. Следите за тем, чтобы промывочное устройство целиком заполняло ячейки жидкостью и полностью удаляло ее. После последнего цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Для достижения оптимальной промывки рекомендуется использовать режим переполнения (по меньшей мере, 600 мкл промывочного буфера на лунку). Если число промывок будет превышать 5, это улучшит результат промывки.

9.6 Вторая инкубация

Внесите в каждую лунку по 2 капли (100 мкл) субстрата **Substrate**. Инкубируйте в течение **15 минут** при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте.

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 1 капле (50 мкл) стоп-реагента **Stop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 600 нм) против бланка по воздуху (т.е. без планшета).

Примечание:

При очень высокой концентрации антигенов астровируса в образце пациента в лунках с субстратом может образовываться темный осадок.

Краткая схема исследования:

1. Прогрейте все реагенты при комнатной температуре.
2. Разведите промывочный буфер.
3. Приготовьте суспензию кала (1:11).
4. Внесите в лунки 100 мкл (2 капли) суспензии, положительного и отрицательного контролей.
5. Добавьте 2 капли конъюгата фермента; инкубируйте 60 мин при комнатной температуре.
6. Вытряхните инкубат и промойте 5 раз 300 мкл промывочного буфера.
7. Добавьте 2 капли субстрата/хромогена; инкубируйте 15 мин при комнатной температуре в темноте.
8. После добавления 1 капли стоп-реагента проведите спектрофотометрическое измерение.

10. АНАЛИЗ

10.1. Контроль качества

Для проверки контроля качества положительный и отрицательный контроли должны включаться в каждую серию определений, поскольку это позволяет убедиться в стабильности использованных реагентов и правильной постановке анализа. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность (ОП) отрицательного контроля ниже 0,2 и оптическая плотность положительного контроля выше 0,8 при длине волны 450 нм. Если оптическая плотность отрицательного контроля выше 0,2, это может свидетельствовать о недостаточной отмывке.

Если значения контролей не соответствуют предъявляемым требованиям или субстрат помутнел или окрасился в голубой цвет до внесения в лунки, это может свидетельствовать об истечении срока годности реагентов. Пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

10.2. Расчет уровня отсечения

Cut-off (уровень отсечения) определяют прибавлением 0,15 единиц к измеренной оптической плотности отрицательного контроля:

$$\text{Cut-off} = \text{ОП (К)} + 0,15$$

10.3. Интерпретация

Образцы считают **положительными**, если оптическая плотность более чем на 10% превышает уровень отсечения.

Образцы, оптическая плотность которых лежит в пределах $\pm 10\%$ от уровня отсечения не могут быть достоверно отнесены к положительным или отрицательным. Их следует рассматривать, как **неопределенные** (или сомнительные). В таких случаях следует повторить исследование с новым образцом. Если результат повторного исследования вновь окажется неопределенным, образец следует рассматривать, как отрицательный.

Образцы считают **отрицательными**, если их оптическая плотность более чем на 10% ниже уровня отсечения.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система RIDASCREEN® Giardia выявляет антигены *Giardia lamblia* в образцах кала. Тест не может быть использован для установления зависимости между значениями оптической плотности и выраженностью клинической картины. **Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клиническим диагнозом.**

Положительный результат на *Giardia lamblia* не исключает присутствия в образце других патогенных микроорганизмов.

Отрицательный результат в целом не исключает возможности лямблиозной инфекции. Это может быть вызвано прерывистой экскрецией вируса или недостаточным для определения количеством антигенов в образце. Если у пациента анемия или имеется обоснованное подозрение на наличие лямблиозной инфекции, следует провести анализ другого образца кала этого пациента через четыре недели.

Неопределенный результат может быть связан с неравномерным распределением вируса в образце кала. В этом случае следует выполнить анализ другой суспензии того же образца кала или анализ другого образца кала.

12. КЛИНИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

12.1. Клиническое исследование

С помощью теста RIDASCREEN® Giardia в клинике были проанализированы 276 образцов кала. Образцы брали у немецких пациентов, вернувшихся из-за границы в период сентябрь 1999 - март 2000 г. Эти пациенты обращались с различными жалобами в Центр инфекционных заболеваний и тропической медицины в Мюнхене. Все образцы исследовались на наличие яиц глист и паразитов с помощью железогематоксилинового и SAF-обогащенного методов прямой микроскопии, при этом каждый слайд изучался двумя опытными микроскопистами в течение 10 минут. Аликвоты свежееотобранных образцов кала пациентов замораживали при -20°C сразу же после их прибытия. После оттаивания образцы исследовали с помощью ИФА метода, в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Тестирование показало отсутствие перекрестной реактивности по отношению к другим кишечным паразитам. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты исследования с помощью ИФА набора RIDASCREEN® Giardia и обычной микроскопии.

		Микроскопия	
Тест RIDASCREEN® Giardia		Положительный результат	Отрицательный результат
	Положительный результат	21	1
	Отрицательный результат	0	254

Чувствительность	100,0%
Специфичность	99,6%
Положительные прогнозируемые значения	95,5%
Отрицательные прогнозируемые значения	100,0%

12.2. Проверка перекрестной реактивности

С помощью набора RIDASCREEN® Giardia были протестированы различные патогенные организмы кишечного тракта. Перекрестные реакции обнаружены не были. В параллельном определении исследовали различные бактерии, которые использовали в виде суспензии после выращивания в течение ночи в BHI-среде, содержащей 10^6 - 10^8 бактерий в мл. Поглощение измеряли при 450 нм. Результаты показаны в таблице 3.

Таблица 3. Перекрестная реактивность с бактериями.

Микроорганизм	Происхождение	Результат	Результат анализа в ед. оптической плотности
			суспензия
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	DSM 2403	Отрицательный	0,004
<i>Aeromonas hydrophilia anaerogenes</i>	DSM 30022	Отрицательный	0,007
<i>Aeromonas hydrophilia hydrophilia</i>	DSM 30016	Отрицательный	0,004
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30047	Отрицательный	0,007
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	Отрицательный	0,005
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	Отрицательный	0,003
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	Отрицательный	0,002
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477	Отрицательный	0,001
<i>Escherichia coli</i>	Изолированная	Отрицательный	0,001
<i>Escherichia coli</i>	Изолированная	Отрицательный	0,006
<i>Escherichia coli</i>	Изолированная	Отрицательный	0,005
<i>Escherichia hermanni</i>	DSM 4560	Отрицательный	0,006
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 20481	Отрицательный	0,007
<i>Listeria innocua</i>	SLCC 5639	Отрицательный	0,004
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788	Отрицательный	0,002
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479	Отрицательный	0,001
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 30119	Отрицательный	0,005
<i>Providencia stuartii</i>	DSM 6676	Отрицательный	0,007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 939	Отрицательный	0,009
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 4358	Отрицательный	0,004
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50124	Отрицательный	0,006
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291	Отрицательный	0,005
<i>Salmonella agona</i>	Изолированная	Отрицательный	0,001
<i>Salmonella choleraesuis</i>	DSM 4224	Отрицательный	0,004
<i>Salmonella infantis</i>	Изолированная	Отрицательный	0,006
<i>Salmonella ohio</i>	Изолированная	Отрицательный	0,006
<i>Salmonella typhimurium</i>	Изолированная	Отрицательный	0,004
<i>Serratia proteamaculans</i>	DSM 4487	Отрицательный	0,007
<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782	Отрицательный	0,009
<i>Shigella sonnei</i>	DSM 5570	Отрицательный	0,008
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20372	Отрицательный	0,005
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Изолированная	Отрицательный	0,038
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Изолированная	Отрицательный	0,005

<i>Streptococcus uberis</i>	Изолированная	Отрицательный	0,008
<i>Escherichia coli</i> (0157:H-)	Изолированная	Отрицательный	0,005
<i>Escherichia coli</i> (0116:H21)	Изолированная	Отрицательный	0,005
<i>Escherichia coli</i> (0111:H-)	Изолированная	Отрицательный	0,007
<i>Escherichia coli</i> (026:H8)	Изолированная	Отрицательный	0,004
Отрицательный контроль, TSB			0,004
Положительный контроль набора			1,796
Уровень отсечения			0,146
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	0,054	
<i>Salmonella enteritidis</i>	DSM 9898	0,098	
<i>Campilobacter jejuni</i>	DSM 4688	0,068	
<i>Campilobacter coli</i>	DSM 4689	0,047	
<i>Campilobacter fetus</i>	DSM 5361	0,098	
<i>Morganella morganii</i>	DSM 6675	0,082	
Положительный контроль		2,139	
Отрицательный контроль		0,095	
Уровень отсечения (cut-off)		0,245	

12.3. Проверка перекрестной реактивности с яйцами глист и другими паразитами

Методом ИФА исследовали различные разведенные (1:11) образцы кала, предварительно проверенные микроскопированием. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4. Перекрестная реактивность с яйцами глист и другими паразитами.

Результаты микроскопирования	Тест RIDASCREEN® Giardia (cut-off = K + 0,15)
Яйца <i>Schistosoma mansoni</i>	Отрицательный
Яйца <i>Taenia solium</i>	Отрицательный
Яйца <i>Trichuris trichiura</i>	Отрицательный
Яйца <i>Ascaris lumbricoides</i>	Отрицательный
Яйца <i>Enterobius vermicularis</i>	Отрицательный
Яйца <i>Hymenolepis nana</i>	Отрицательный
Яйца <i>Ankylostoma duodenale</i>	Отрицательный
Цисты <i>Entamoeba coli</i>	Отрицательный
Цисты <i>Entamoeba hartmanni</i>	Отрицательный
Цисты <i>Iodamoeba butschlii</i>	Отрицательный
Цисты <i>Blastocystis hominis</i>	Отрицательный
Цисты <i>Cryptosporidia</i>	Отрицательный

12.4. Воспроизводимость измерения

Была определена воспроизводимость результатов, полученных в пределах одного исследования в 24 повторных определениях положительного контроля (суспензия цист), а также в средне- (32 образца) и низко титруемых (754 образца) образцах кала и отрицательного контроля (буфер для разведения образцов, содержащих паразиты, USP). Результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5. Воспроизводимость данных в пределах одного исследования.

	Положительный контроль	Образцы 32	Образцы 754	Отрицательный контроль
Среднее (ОП)	2,343	0,987	0,533	0,045
Стандартное отклонение	0,138	0,068	0,028	0,002
Коэффициент вариации, %	5,9	6,9	5,3	4,4

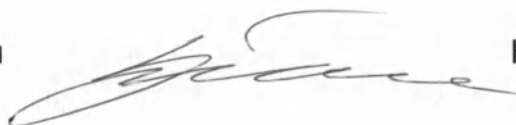
Воспроизводимость результатов для различных серий исследования была определена в 4-х опытах в течение 4 дней с использованием 4 различных партий набора RIDASCREEN® Giardia с одним и тем же образцом, который также был использован для исследования воспроизводимости в пределах одного исследования. Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6. Воспроизводимость результатов, полученных в разных экспериментах.

	Положительный контроль	Образцы 32	Образцы 754	Отрицательный контроль
Среднее (ОП)	1,988	1,021	0,592	0,052
Стандартное отклонение	0,102	0,037	0,043	0,006
Коэффициент вариации, %	5,13	3,62	7,26	11,54

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»
М.И. Прищепа
ноября 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения веротоксинов 1 и 2
энтерогеморрагических эшерихий коли (RIDASCREEN® Verotoxin)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Verotoxin

Иммуноферментный тест для качественного обнаружения веротоксина 1 и 2 в образцах кала.

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для диагностического обнаружения *in vitro* веротоксина 1 и 2 (шига-подобные токсины I и II типа) *Escherichia coli* в образцах кала и обогащенных культурах.

2. ВВЕДЕНИЕ

Энтеробактерии, относящиеся к виду *Escherichia coli*, являются нормальной кишечной флорой человека и многих сельскохозяйственных животных. Таким образом, они служат индикатором загрязнения воды и пищи фекалиями. Энтеробактерии относятся к грам-отрицательным факультативным анаэробным палочковидным бактериям, которые передвигаются с помощью перитрихальных жгутиков. На основе О-антигенов (LPS, липополисахариды внешней мембраны) и Н-антигенов (антигены жгутиков) *E. coli* можно разделить на различные серотипы. *E. coli* относят к факультативно патогенным бактериям из-за различных патогенных факторов, которые часто кодируются в плазмидах или передаются фагами. С 1977 г. известны бактерии *E. coli*, которые способны продуцировать два цитотоксина - веротоксин 1 и 2. Гены для этих веротоксинов (VT) локализованы в хромосоме в области профага. Были изолированы *E. coli*, в которых содержались либо оба гена, либо всего лишь один. Из-за сходства веротоксинов с шига-токсином *Shigella dysenteriae*, их также называют шига-подобным токсином I и II (SLT-I и -II). Некоторые из этих веротоксинов, продуцируемых *E. coli* (VTEC), могут вызывать тяжелую форму геморрагической диареи, которая возникает из-за последующего образования патогенных факторов. «Прототип» этих геморрагических *E. coli* (EHEC) был впервые обнаружен в 1982 г., он принадлежал к серотипу O157:H7. В настоящее время описаны EHEC различных О-серотипов. К важным дополнительным патогенным факторам, которые характерны для бактерий EHEC типов, относят кодируемые в плазмидах энтерогемолизин и тимин-адгезин. Их ген (*eae* A) вместе с другими вирулентными факторами локализован в островке патогенности (PAI) хромосомы. Клинические симптомы заболеваний, вызываемых EHEC, колеблются от легких до крайне тяжелых форм гастроэнтеритов и геморрагических колитов, которые наблюдаются в 10-20% всех инфекций. При формировании гемолитического уремического синдрома (HUS) или тромбозной тромбоцитопенической пурпуры (TTP) это может привести к опасным для жизни постинфекционным осложнениям в 5-10% инфекций, в особенности у детей и младенцев, но также и у стариков и пациентов с ослабленной иммунной системой. Летальные исходы в случае HUS и TTP в особенности высоки (прибл. 10-15%) у детей. Инфекция может привести к острому поражению почек, что потребует временного проведения гемодиализа, но возможна и необратимая потеря функции почек, после чего гемодиализ будет необходим постоянно. Различия в клинической картине, с одной стороны, зависят от предрасположенности пациента, а, с другой стороны, от соответствующих EHEC-фенотипов. Это означает, что развитие болезни также зависит от различной степени экспрессии патогенных факторов. До сих пор важную роль играют и неизвестные в настоящее время факторы. Инкубационный период зависит от масштаба инфекции и может колебаться от 1 до 3 дней, иногда продолжаясь до 8 дней. Из-за высокой устойчивости в окружающей среде и относительной устойчивости к кислотам инфекционный уровень EHEC составляет приблизительно 100 бактерий. Основным источником инфекции являются продукты, приготовленные из мяса крупного рогатого скота, овец и коз, в особенности непрожаренные и непроваренные мясо и мясные продукты и

непастеризованное молоко. Также важное значение имеют цепочки передачи инфекции от человека к человеку, в особенности в таких общественных учреждениях, как детские учреждения, дома престарелых или госпитали, а также непосредственный контакт с животными. В окружении пациентов определяют бессимптомных носителей инфекции. Оказалось, что некоторые из общепринятых диагностических методов определения инфекции ЕНЕС имеют определенные недостатки. Так как только около 1% бактерий *E. coli*, которые точно принадлежат к группе ЕНЕС, способны продуцировать энтерогемолизин, обнаружение энтерогемолитических бактерий *E. coli* на кровяном агаре – действительно важный индикатор присутствия ЕНЕС. Но существуют также бактерии ЕНЕС, которые были изолированы у пациентов, больных HUS и которые не продуцируют энтерогемолизин. Кроме того, было показано, что первый обнаруженный тип O157 ответственен только за 70-80% всех случаев HUS, обнаруживаемых в Германии. В случае чистых гастроэнтеритов доминируют другие серотипы. Таким образом, определение только серотипа O157 недостаточно. В настоящее время рекомендована диагностическая процедура, состоящая в обогащении патогена в течение ночи в среде mTSB (с добавлением митомицина С, 50 нг/мл) с последующим выделением. Чтобы надежно доказать присутствие патогенного фактора, необходимо одновременно провести определение веротоксина в культуре клеток. Это можно сделать с применением иммунологических методов ИФА или, определяя цитопатическое влияние на культуру вероцитов (цитотоксическое определение). По сравнению с цитотоксическим определением такой иммуноферментный тест, как RIDASCREEN® Verotoxin – простой метод, который можно применять в каждой лаборатории. Для того и другого методов необходимо обогащение бактерий, так как их экскреция, а также содержание токсина в кале могут быть очень низкими. В особенности для пациентов с HUS и TTP экскреция может прекратиться полностью. Чтобы получить быстрые результаты, в некоторых случаях можно определить токсин непосредственно в образце кала без обогащения. Из-за низкой чувствительности этой процедуры отрицательные результаты могут интерпретироваться только как предварительные. В этом случае рекомендуется дождаться результатов определения после обогащения культуры бактерий. При терапии HUS и TTP можно рекомендовать только симптоматическое лечение. Оно обычно состоит в форсированном диурезе и плазмафорезе. В случае полной почечной недостаточности применяют гемо- или брюшинный диализ. Антибактериальную терапию обычно не применяют, так как экскреция бактерий увеличивается, а образование токсина даже стимулируется.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

В иммуноферментном тесте RIDASCREEN® Verotoxin используются специфические антитела и принципы сэндвич-анализа. На поверхность лунок микропланшета адсорбируют специфические антитела к веротоксину 1 и 2. В лунки вносят разведенные тестируемые образцы кала и контроли и инкубируют при комнатной температуре (20-25 °C). После процедуры промывки в лунки вносят специфические антитела к веротоксинам, конъюгированные с пероксидазой хрена, и планшет инкубируют при комнатной температуре (20-25 °C). Если в образце присутствует веротоксин, образуется сэндвич-комплекс, сформированный иммобилизованными антителами, веротоксинами и антителами, конъюгированными с ферментом. Несвязавшиеся меченные ферментом антитела удаляют промывкой. Если тест положительный, после внесения субстрата фермент, связавшийся с лунками, превращает бесцветный субстрат в окрашенный в синий цвет продукт. Добавление стоп-реагента меняет окраску с синего цвета на желтый. Оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации токсина, присутствующего в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет 96-луночный: в рамке-держателе, состоящий из двенадцати 8-луночных стрипов с разделяемыми лунками, с адсорбированными моноклональными антителами мыши к веротоксину 1 и 2; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
Diluent	Буфер для разведения образцов: содержит белковый забуференный раствор NaCl и 0,05% проклин 300; окрашен в зеленый цвет; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash	Промывочный буфер: 10x концентрат; содержит фосфатный буфер, NaCl и 0,1% тимерозал (мертиолят)	1 x 100 мл
Control +	Положительный контроль: инаktivированные веротоксины; содержит 0,1% Kathon; готов к использованию	1 x 1,8 мл
Conjugate	Конъюгат фермента: моноклональные антитела к веротоксину 1 и 2, конъюгированные с пероксидазой хрена; в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,05% проклин 300; окрашен в зеленый цвет; готов к использованию.	1 x 10 мл
Substrate	Субстратный раствор: содержит пероксид мочевины / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 10 мл



Стоп-реагент: содержит 1 N серную кислоту; готов к использованию
Инструкция по применению

1 x 6 мл

5. ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать только до истечения срока годности, указанного на этикетках флаконов. Разведенный промывочный буфер сохраняется в течение 4 недель при хранении при 2-8 °С. Необходимо исключить микробную контаминацию. Гарантийные обязательства при несоответствии качества набора не удовлетворяются после истечения срока его годности. Пакет из фольги необходимо открывать с помощью ножниц, не повреждая застёжку. Неиспользованные стрипы сразу же положите обратно в пакет из фольги, запечатайте пакет и храните его при 2-8 °С. Бесцветный раствор субстрата необходимо хранить в защищенном от света месте, чтобы избежать порчи или появления окраски в результате самоокисления. Если субстрат приобрел синее окрашивание, этот реагент использовать нельзя.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1. Реагенты

- Дистиллированная или деионизованная вода

6.2. Оборудование

- Бульон для обогащения бактериальной культуры RIDA® Enrichment Broth (кат. № Z1000)
- Одноразовые трансфер-пипетки (кат. № Z0001)
- Вортекс (дополнительно, см. раздел 9.3)
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 50 - 100 мкл и на 1 мл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Таймер
- Прибор для промывания планшетов или многоканальная пипетка (300 мкл)
- Фотометр (ридер ELISA) (450 нм, при необходимости дополнительная длина волны сравнения ≥ 600 нм)
- Фильтровальная (или любая другая впитывающая бумага, например, бумажные полотенца)
- Контейнер для отходов, заполненный 0,5% раствор гипохлорита

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Набор можно использовать только в диагностических целях *in vitro*.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилам работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию теста.

Положительный контроль содержит инактивированный веротоксин. Несмотря на это, следует придерживаться принятых национальных мер предосторожности и обращаться с положительным контролем, а также с образцами пациентов как с веществами, несущими потенциальную инфекционную опасность.

Не пипетируйте образцы и реагенты с помощью рта. Не допускайте их контакта с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками, а после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Положительный контроль, буфер для разведения образцов и конъюгат содержат 0,05% проклин 300 в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми.

Промывочный буфер содержит 0,1% тимерозал (мертиолят) в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми.

Пероксид мочевины может вызвать ожоги. Обращайтесь с реагентом с осторожностью!

Стоп-реагент содержит 1N серную кислоту. Избегайте контактов с кожей и одеждой! При попадании реагента на кожу промойте пораженный участок большим количеством воды.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавировать при 121 °С не менее 1 часа.

ВНИМАНИЕ: Чтобы не допустить образование ядовитых газов, перед добавлением раствора гипохлорита все жидкие отходы, содержащие стоп-реагент, необходимо нейтрализовать.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Образцы для тестирования до анализа необходимо хранить при 2-8 °С. Если материал не планируют использовать в тесте в течение 3 дней, его рекомендуется хранить при -20 °С и ниже. Необходимо исключить многократное замораживание и оттаивание образцов. Образцы кала или ректальные тампоны нельзя транспортировать в контейнерах, в которых находятся среды с консервантами, сывороткой крови животных, ионами металлов, окислителями или детергентами, так как эти соединения могут помешать выполнению теста RIDASCREEN® Verotoxin. Если используют ректальные тампоны, убедитесь в том, что

собранное количество материала достаточно для выполнения теста (приблизительно 100 мг). При прослеживании контактов, чтобы выявить бессимптомных носителей, образцы кала следует также отбирать у контактировавших людей, не имеющих признаки заболевания.

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1 Основная информация

Перед использованием прогрейте все реагенты и пакет со стрипами **Plate** при комнатной температуре (20-25 °C). Стрипы не следует вынимать из алюминиевого пакета до тех пор, пока он не прогреется до комнатной температуры. Прямо перед использованием все реагенты необходимо тщательно перемешать. После проведения теста неиспользованные стрипы (в запечатанном пакете) и реагенты необходимо хранить при 2-8 °C. Стрипы, отработанные в анализе, повторно не используются. Реагенты и стрипы нельзя использовать, если была нарушена упаковка или если обнаружены признаки подтекания реагентов из флаконов. Чтобы не допустить перекрестного загрязнения, необходимо исключить прямой контакт образцов с компонентами набора. При проведении теста избегайте попадания прямого солнечного света. Мы рекомендуем закрывать планшет крышкой или пленкой, чтобы не допустить испарения жидкости.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Одну часть концентрированного промывочного буфера **Wash** разводят девятью частями дистиллированной воды (**разведение 1:10**). Кристаллы в концентрате буфера нужно растворить на водяной бане при 37°C.

9.3. Приготовление образцов

Чтобы быстро получить ранние результаты, необходимо провести прямое определение токсина в образце кала. Из-за возможного низкого содержания токсина в кале отрицательный результат не следует рассматривать как доказательство отрицательного диагноза на ЕНЕС. Обычно, чтобы достичь удовлетворительной чувствительности, определение токсина проводят после обогащения культуры бактерий даже в случае отрицательного результата анализа кала. В Германии в настоящее время рекомендуется проводить обогащение культуры в течение ночи на шейкере при 37°C в mTSB-среде с добавлением митомицина С (50 нг/мл). Другие среды для обогащения культуры, такие как BRILA или GN-Broth, не дают никаких отрицательных эффектов (эффекты матрицы) при проведении теста RIDASCREEN® Verotoxin, однако они не соответствуют средам обогащения, рекомендованным ассоциацией производителей.

9.3.1. Тестирование свежих или замороженных образцов кала

Образцы кала разводят **1:5 (v/v)** в буфере для разведения образцов, содержащих веротоксин. Для этого отберите приблизительно 1 мл жидкого кала с помощью пастеровской пипетки (трансфер-пипетка, Кат. № Z 0001) и суспендируйте в промаркированной пробирке в 4 мл буфера. Если кал твердый, отберите эквивалентное количество с помощью одноразовой инокуляционной петли. Гомогенизируйте суспензию кала, набирая и выпуская ее из трансфер-пипетки или тщательно перемешивая на Вортексе. После некоторого времени оседания (около 10 мин - полное осаждение) для тестирования можно непосредственно использовать 100 мкл суспензии кала.

Примечание: Из-за низкой чувствительности определение в образцах кала без обогащения необходимо рассматривать как предварительный экспресс-анализ, который следует проводить только в экстренных случаях для анамнеза. Отрицательный результат не показателен. В этом случае необходимо дожидаться результатов тестирования после обогащения культуры.

9.3.2. Тестирование образцов после обогащения культуры

Протокол, описанный ниже, соответствует рекомендациям RKI (Robert-Koch-Institut) и BGVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin). Пожалуйста, также обратите внимание на процедуру проведения теста RIDA® Enrichment Broth (кат. № Z1000). Супернатант культуры, обогащенной RIDA® Enrichment Broth, после кратковременного центрифугирования можно сразу же использовать для выполнения теста без дальнейшего разведения.

Примечание: Пожалуйста, внимательно следите за тем, чтобы температура бульона и отрицательного контроля (перед началом теста оба реагента необходимо довести до комнатной температуры (20-25 °C)) была выровнена. Повышенная температуры бульона может привести к получению ошибочных положительных значений оптической плотности.

Вначале перенесите 100 мкл образцов жидкого кала или эквивалентное количество (50-100 мг) образцов твердого кала в 4 мл mTSB-среды с митомицином С (например, среды RIDA® Enrichment Broth, кат. № Z1000) и инкубируйте в течение 18-24 часов при перемешивании (прибл. 120-160 оборотов в мин) и при достаточной аэрации при 37 °C. Для перемешивания подходят горизонтальные шейкеры и вращающиеся миксеры. После инкубации образцы необходимо отцентрифугировать в течение 15 мин при 3000 оборотах в мин. Для проведения иммуноферментного теста используют 100 мкл прозрачного супернатанта.

Осадки, а также исходные образцы кала необходимо сохранить в случае необходимости дополнительного подтверждения результатов. Идеальным способом сохранения осадков является абсорбция осадков с помощью тампона с последующим переносом в среду для транспортировки (Amies, Stuart- или Cary Blair) и хранением при 2-8°C вплоть до отсылки.

9.4. Первая инкубация

Поместите в держатель необходимое количество лунок. В отдельные лунки внесите по 2 капли (100 мкл) положительного контроля **Control +**, буфера для разведения образцов **Diluent** (отрицательный контроль) или разведенных образцов и инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) в течение 60 минут. В качестве отрицательного контроля вместо буфера для разведения образцов **Diluent** также можно использовать культуральную среду Enrichment broth.

9.5. Промывка

Для получения точных результатов необходимо тщательно и в полном соответствии с инструкцией проводить процедуру промывки. Вещества, инкубированные в лунках, необходимо удалять из стрипов в контейнер для отходов, содержащий гипохлорит в качестве дезинфицирующего раствора. Чтобы обеспечить полное удаление жидкости из лунок, постучите перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. Затем промойте планшет 5 раз, каждый раз используя по 300 мкл промывочного буфера. Убедитесь в том, что при каждом цикле промывки вы полностью удаляете жидкость из лунок, для этого энергично постучите перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге, которая каждый раз должна быть сухой и ранее не использованной.

При применении прибора для автоматической промывки планшетов, убедитесь в том, что прибор отрегулирован под тот тип планшета, который используется в данном тесте. Перед первой промывкой суспензию кала, которая не была освобождена от взвешенных частиц, необходимо вытряхнуть из планшета вручную, чтобы предотвратить засорение игл для промывки. Также во время промывки убедитесь в том, что после каждого цикла жидкость из лунок была откачана полностью. После финальной промывки необходимо энергично постучать перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге или бумажному полотенцу, чтобы удалить все остатки жидкости. Чтобы достигнуть оптимальных результатов промывки, рекомендуется эту процедуру проводить в режиме переполнения, используя на каждой стадии не менее 600 мкл промывочного буфера на лунку. Количество стадий промывки может превышать 5, и обычно это приводит к достижению лучших результатов.

9.6. Вторая инкубация

Добавьте в каждую лунку по 2 капли (100 мкл) ферментного конъюгата **Conjugate** и инкубируйте при комнатной температуре (20-25°C) в течение 30 минут.

9.7. Промывка

Промывка – см. раздел 9.5. Выполняйте эту стадию в соответствии с инструкцией.

9.8. Третья инкубация

Добавьте в каждую лунку по 2 капли (100 мкл) субстрата **Substrate**. Инкубируйте планшет 15 мин при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте. После инкубации реакцию останавливают добавлением в каждую лунку по 1 капле (50 мкл) стоп-реагента **Stop**. После аккуратного перемешивания (мягкое постукивание по краю планшета) измеряют оптическую плотность при 450 нм, используя длину волны сравнения ≥ 600 нм (не обязательно). Прибор обнулите против воздуха, т.е. в отсутствие планшета.

Примечание: Сильно положительные образцы пациентов могут давать образование темных осадков субстрата.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для контроля за качеством теста в каждое измерение необходимо включить положительный и отрицательный контроли, чтобы убедиться в стабильности реагентов и правильном выполнении анализа. Измерение проведено правильно, если оптическая плотность (OD) отрицательного контроля при 450 нм ниже 0,25, а оптическая плотность положительного контроля при 450 нм выше 0,8. Если ОП отрицательного контроля выше 0,25, это может указывать на недостаточно полную промывку. Если ожидаемые значения контролей не укладываются в полученные результаты или если раствор субстрата мутный или приобрел голубую окраску до того, как его внесли в лунки, это может указывать на то, что срок годности реагентов набора истек. Если вы не получили результаты, указанные выше, перед тем, как повторить тестирование, проверьте следующие позиции:

- Срок годности реагентов

- Калибрование используемых инструментов
- Точность исполнения анализа
- Визуальный контроль признаков загрязнения, порчи или утечки компонентов набора; раствор субстрата нельзя использовать, если он имеет синее окрашивание.

Если результаты, полученные для контролей, отличаются от ожидаемых даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком.

11. ОЦЕНКА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

11.1. Расчеты уровня отсечения (cut-off)

В зависимости от исследуемых образцов (супернатант обогащенной культуры или образец кала без обогащения) для анализа необходимо рассчитать различные пороговые значения.

11.2.1. Тестирование образцов обогащенной культуры

Уровень отсечения определяя прибавлением 0,1 единицы оптической плотности к измеренному значению ОП отрицательного контроля.

Уровень отсечения = оптическая плотность отрицательного контроля + 0,1

11.2.2. Тестирование свежих или замороженных образцов кала (без процедуры обогащения)

Уровень отсечения определяя прибавлением 0,2 единицы оптической плотности к измеренному значению ОП отрицательного контроля.

Уровень отсечения = оптическая плотность отрицательного контроля + 0,2

11.3. Результаты теста

Образцы считают **положительными**, если их оптическая плотность более чем на 10% выше порогового уровня отсечения.

Образцы, у которых оптическая плотность в пределах $\pm 10\%$ от порогового уровня следует относить к **промежуточным**. Такие образцы следует протестировать снова. Если после повторного исследования нового образца кала результаты определения снова попадают в так называемую «серую зону», образец следует считать отрицательным.

Образцы считают **отрицательными**, если их оптическая плотность ниже порогового уровня отсечения более чем на 10%.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Verotoxin определяет антигены веротоксинов 1 и 2, продуцируемых *E. coli*, в образцах кала или обогащенных культурах. На основании полученных при тестировании значений оптической плотности нельзя прогнозировать появление серьезных клинических симптомов.

Полученные результаты измерения необходимо интерпретировать только в совокупности с клинической картиной. Положительные результаты определения токсина с одновременной идентификацией *E. coli* рассматривают как надежный метод определения ЕНЕС.

Положительные результаты не исключают присутствия других инфекционных патогенов.

Отрицательные результаты не означают отсутствия инфекции *E. coli*, продуцирующих веротоксин. Это происходит из-за пульсирующего выделения паразита или из-за невысокого содержания паразита в кале. Если пациент страдает анемией или если есть причины подозревать наличие инфекции *E. coli*, продуцирующих веротоксин, необходимо исследовать другой образец кала. Некоторые штаммы ЕНЕС продуцируют очень небольшие количества веротоксина.

Часто из-за очень низкого содержания веротоксина в образцах кала прямое определение токсина в кале недостаточно чувствительно. Положительный результат определения токсина в образце кала может быть быстрым указанием на возможную ЕНЕС-инфекцию. С другой стороны, отрицательный результат не может исключить инфекцию ЕНЕС.

Промежуточные результаты могут быть вызваны неравномерным распределением бактерий в образце. В этом случае необходимо исследовать другую суспензию кала или получить другой образец.

При положительном результате определения токсина в любом случае необходимо провести выделение *E. coli*. Только идентификация и характеристика патогена может связать между собой обнаружение токсина и клинические симптомы. Несмотря на наличие ЕНЕС-инфекции, определение токсина в обогащенной культуре может дать отрицательный результат. Из-за различных условий роста обогащение культуры может быть недостаточным. Кроме того, даже в случае успешно проведенного обогащения культуры *E. coli*, содержание токсина в культуральной среде может быть таким низким, что результат определения будет отрицательным. Причиной этому может быть низкий процент ЕНЕС среди физиологических видов *E. coli* в кишечной флоре (иногда на 200-300 клеток *E. coli* встречается только одна клетка ЕНЕС) или прекращение образования и секреции токсина из-за условий роста. Поэтому может случиться, что определение токсина непосредственно в анализе кала покажет слабоположительный результат, тогда как определение в культуральной среде даст отрицательный результат.

Благодаря высокой чувствительности метода RIDASCREEN® Verotoxin низкие положительные или промежуточные результаты могут возникать из-за неспецифических эффектов матрицы при определении исходных образцов кала. По этой причине, если непосредственно исследуются анализы кала, необходимо очень тщательно проводить процедуру промывания. При образовании такого пост-инфекционного синдрома, как HUS и TTP, число бактерий EHEC в кале может уменьшаться до такой степени, что выделение бактерий становится невозможным. В этих случаях иммуноферментный анализ ELISA Веротоксина будет также отрицательным. Поэтому очень важно исследовать образцы кала как можно раньше во время кишечной стадии заболевания.

Кроме того, мы рекомендуем ознакомиться с планом диагностики EHEC, рекомендованным Национальным референсным центром института Р. Коха (ссылка 15 в полной версии оригинала инструкции на английском языке).

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Качество тестирования

С помощью метода RIDASCREEN® Verotoxin в клиническом исследовании были протестированы 223 образца кала после процедуры обогащения: среди них 221 образец был также протестирован в виде разведенной суспензии исходного материала без обогащения. В этом исследовании в качестве сравнительного метода было использовано цитотоксическое определение вероцитов. В это же время ИФА-метод RIDASCREEN® Verotoxin сравнивали с коммерчески доступным иммуноферментным методом определения веротоксина, разработанным в Институте П. Эрлиха. Результаты исследования супернатантов обогащенных культур приведены в таблице 2. В цитотоксическом определении супернатанты разводили 1:5. Оба иммуноферментных определения проводили в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

Таблица 2. Результаты определения с использованием теста RIDASCREEN® Verotoxin в супернатантах обогащенных культур бактерий.

		ИФА RIDASCREEN® Verotoxin (после обогащения)		Другой метод ИФА (после обогащения)	
		+	-	+	-
Цитотоксическое определение* (после обогащения)	+	24	6	22	8
	-	3	190	3	190

*Из одного из этих образцов, для которого в цитотоксическом измерении не был получен положительный результат, можно было выделить веротоксин-продуцирующие *E. coli* (VTEC); при расчетах чувствительности и специфичности методов этот образец считали положительным.

Чувствительность: 83,3%

Специфичность: 98,4%

Чувствительность: 76,6%

Специфичность: 98,4%

Результаты исследования исходных образцов кала методом иммуноферментного анализа без обогащения культуры представлены в таблице 3. В качестве метода сравнения использовали цитотоксическое определение после обогащения культуры бактерий. При использовании метода RIDASCREEN® Verotoxin, а также цитотоксического определения образцы кала разводили 1:5 средой TSB. Иммуноферментный анализ проводили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Таблица 3. Результаты определения с использованием теста RIDASCREEN® Verotoxin в исходных образцах кала.

		RIDASCREEN® Verotoxin EIA (в образцах кала без обогащения)		Другой метод EIA (в образцах кала без обогащения)	
		+	-	+	-
Цитотоксическое определение* (после обогащения)	+	9	19	11	17
	-	3	190	1	192

*Из одного из этих образцов, для которого в цитотоксическом измерении не был получен положительный результат, можно было выделить веротоксин-продуцирующие *E. coli* (VTEC); при расчетах чувствительности и специфичности методов этот образец считали положительным.

Чувствительность: 35,7%
 Специфичность: 98,4%

Чувствительность: 42,8%
 Специфичность: 99,5%

Похожая низкая чувствительность была обнаружена, когда исходные образцы кала исследовали в цитотоксическом определении без предварительного обогащения (данные не приведены). Эти результаты показывают, что прямое определение токсина в образцах кала не является достаточно чувствительным методом, который можно было бы рекомендовать в качестве рутинной процедуры определения, и всегда необходимо подтверждение результатов с использованием метода обогащения культуры.

13.2. Аналитическая чувствительность

Аналитическую чувствительность теста RIDASCREEN® Verotoxin сравнивали с чувствительностью апробированного метода определения веротоксина. С этой целью частично очищенные супернатанты культуры клеток указанных штаммов, продуцирующих как веротоксин 1, так и веротоксин 2, подвергали серийному разведению буфером для разведения образцов и определяли значения оптической плотности. Данные приведены в таблице 4. Так как стандарт для веротоксина коммерчески не доступен, содержание белка в препаратах не указано.

Таблица 4. Аналитическая чувствительность ИФА-теста RIDASCREEN® Verotoxin.

Разведение	VT1		VT 2	
	RIDASCREEN® Verotoxin	Другой метод ИФА	RIDASCREEN® Verotoxin	Другой метод ИФА
1 : 300	2.38	2.10	3.35	2.40
1 : 900	1.07	1.33	2.95	1.99
1 : 2700	0.47	0.54	3.00	1.38
1 : 8100	0.35	0.18	1.65	0.81
1 : 24300	0.20	0.06	0.54	0.23
1 : 72 00	0.10	0.05	0.20	0.06
1 : 218700	0.08	0.05	0.12	0.05

	RIDASCREEN® Verotoxin	Другой метод ИФА
Положительный контроль	2.83	1.64
Отрицательный контроль	0.07	0.05
Уровень отсеечения	0.17	0.18

13.3. Перекрестная реактивность

Подходящие для этого случая бактерии инкубировали в течение ночи при 37°C. Культуры, содержавшие более, чем 10⁶ бактерий на мл, использовали для иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией для пользователя (табл 5). В ходе клинического определения бактерии, перечисленные в таблице 5, были также изолированы из образцов, но не дали никаких реакций в тесте RIDASCREEN® Verotoxin.

Таблица 5. Перекрестная реактивность патогенных микроорганизмов (из образцов пациентов).

Микроорганизм
<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Candida albicans</i>
<i>Clostridium difficile</i>
<i>Cryptosporidium</i>
<i>Giardia lamblia</i>
<i>Proteus</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Staph. aureus</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Adenovirus</i>
<i>Rotavirus</i>

Таблица 6. Перекрестная реактивность патогенных микроорганизмов (из культур клеток). *Изоляты

Микроорганизм	OD _{450 нм} – OD _{620 нм}
<i>Acinetob. Iwoffii</i> DSM 2403	0.001
<i>Aeromonas hydrop. anaerogenes</i> DSM 30188	0.002
<i>Aeromonas hydrop. hydrophilia</i> DSM 30016	0.000
<i>Campylobacter coli</i>	0.008
<i>Campylobacter fetus</i>	0.008
<i>Campylobacter jejuni</i>	0.018
<i>Citrob. Freundii</i> *	0.000
<i>Citrob. Freundii</i> DSM 30039	0.006
<i>Enterob. Cloacae</i> DSM 30054	0.005
<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 2570	0.010
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 27164	0.009
<i>E. coli</i> *	0.002
<i>E. coli</i> *	0.002
<i>E. hermanni</i> DSM 4560	0.005
<i>Lactococcus lactis</i> DSM 20481	-0.005
<i>Listeria innocua</i> *	-0.008
<i>Morganella morganii</i>	0.084
<i>Proteus mirabilis</i> DSM 788	0.004
<i>Proteus mirabilis</i> DSM 4479	-0.005
<i>Proteus vulgaris</i> DSM 30119	-0.007
<i>Providencia stuartii</i> DSM 6676	-0.003
<i>Pseudom. aerruginosa</i> DSM 939	0.014
<i>Pseudom. fluorescens</i> DSM 4358	0.006
<i>Pseudom. fluorescens</i> DSM 50124	0.008
<i>Salmonella agona</i> *	0.017
<i>Salmonella braenderup</i> *	-0.003
<i>Salmonella infantis</i> *	-0.005
<i>Salmonella Ohio</i> *	0.001
<i>Salmonella typhimurium</i> *	0.000
<i>Serratia proteamaculans</i> DSM 4487	0.005
<i>Shigella flexneri</i> DSM 4782	0.008
<i>Shigella sonnei</i> DSM 5570	-0.006
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 20372	0.042
<i>Staph. aureus</i> *	-0.004
<i>Strept. agalactiae</i> *	-0.003
<i>Strept. dysgalactiae</i> *	-0.001
<i>Strept. uberis</i> *	0.001
<i>Escherichia coli</i> 026:H8 VT1	2.196
Положительный контроль <i>E. coli</i> VT 1+2 (0157:H7)	2.401
Отрицательный контроль (mTSB)	0.004
Положительный контроль (из набора)	2.008
Уровень отсеечения	0.104

13.4. Воспроизводимость измерения

Были определены различия результатов, полученных внутри одного измерения при 24-кратном повторном анализе 4 различных концентраций антигена веротоксина 1 и 2 (VT 1 и VT 2). Представлены среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации.

Для определения различий между разными измерениями 4 различные концентрации антигена веротоксина 1 и 2 (VT 1 и VT 2) независимо измеряли 11 раз (используя 3 партии набора, 5 лаборантов в течение 7 дней). Представлены среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Результаты приведены в таблице 7.

Таблица 7. Воспроизводимость данных ИФА-теста RIDASCREEN® Verotoxin.

	Отрицательный результат	Низкий положительный результат	Положительный результат	Высокий положительный результат
Внутри одного измерения VT 1				
Среднее значение ОП	0.05	0.651	1.227	1.887
Стандартное отклонение	0.009	0.046	0.058	0.101

Коэффициент вариации (%)	17.93	7.06	4.75	5.37
<u>Внутри одного измерения VT 2</u>				
Среднее значение ОП	0.06	0.869	1.646	2.472
Стандартное отклонение	0.008	0.053	0.08	0.063
Коэффициент вариации (%)	13.46	6.1	5.07	2.53
<u>Между различными измерениями VT 1</u>				
Среднее значение ОП	0.056	0.626	1.192	2.105
Стандартное отклонение	0.008	0.092	0.105	0.111
Коэффициент вариации (%)	14.80	14.70	8.80	5.29
<u>Между различными измерениями VT 2</u>				
Среднее значение ОП	0.056	0.602	1.157	2.088
Стандартное отклонение	0.008	0.051	0.094	0.133
Коэффициент вариации (%)	14.80	8.41	8.15	6.37

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 5 листов.



УТВЕРЖДАЮ



Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»
М.И. Прищепа
«10» ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения IgA антител к бордетелла пертуссис
(RIDASCREEN® Bordetella IgA)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Bordetella IgA

Иммуноферментный тест для качественного и полуколичественного определения антител класса IgA к возбудителю коклюша *Bordetella pertussis* в сыворотке крови человека

Набор для определения антител класса IgA

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест RIDASCREEN® Bordetella IgA – диагностическая *in vitro* иммуноферментная (ИФА) тест-система для выявления антител класса IgA к возбудителю коклюша *Bordetella pertussis* в сыворотке крови человека.

2. ВВЕДЕНИЕ

В результате инфекции *Bordetella pertussis* происходит формирование специфических антител к патогену, определение которых в сыворотке крови возможно с помощью иммунологических методов. Выбор метода и определяемых патогенспецифических антител имеет важное значение для диагностики. Для диагностики острой формы коклюша с обнаружением антител разработан тест фиксации комплемента, однако он обладает слишком низкой чувствительностью. Между тем, с внедрением технологии иммуноферментного анализа с его возможностью дифференцировать отдельные классы иммуноглобулинов, стал доступен чувствительный и быстрый метод определения острых инфекций. Это особенно важно на ранних стадиях развития заболевания из-за высокой инфекционности и неспецифических клинических проявлений в этот период.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител класса IgA к *B. pertussis* основано на двухстадийном непрямом иммуноферментном анализе. Очищенные специфические антигены *B. pertussis* сорбированы на поверхности лунок микропланшета. В лунки вносят разведенные образцы сыворотки крови и контроли и инкубируют при температуре 37 °C во влажной камере. Имеющиеся в них антитела, специфичные к *Bordetella*, связываются с иммобилизованными антигенами. Несвязавшиеся антитела удаляются промывкой. На второй стадии в лунки вносят конъюгированные с пероксидазой антитела к IgA человека. После инкубации несвязавшийся конъюгат удаляется промывкой. В лунки добавляют субстрат и инкубируют при температуре 37 °C во влажной камере. Фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат/хромоген в голубую жидкость. Добавление стоп-реагента меняет ее цвет на желтый. Оптическую плотность измеряют при длине волны 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: в рамке-держателе, состоящий из двенадцати отделяемых 8-луночных стрипов, покрытых токсином пертуссис/гемагглютинин; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
SeroPP	Буфер для разведения образцов: фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,01% тимерозал (мертиолят) и 0,05% Твин 20; желтого цвета; готов к использованию	1 x 110 мл
SeroWP	Промывочный буфер: 10x концентрат; трис-буфер; содержит 0,2% бромидокс-Л и 0,5% Твин 20	1 x 100 мл
Control IgA+	Стандартный контроль IgA: разведенная человеческая сыворотка с IgA человека; синего цвета; содержит 0,01% мертиолят (тимерозал) и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 2,5 мл
Control IgA -	Отрицательный контроль IgA: разведенная человеческая сыворотка, не содержащая IgA человека; содержит 0,01% мертиолят (тимерозал) и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 1,2 мл
SeroA HD синего цвета	Ферментный конъюгат IgA: антитела кролика к IgA человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; стабилизирующий белковый раствор; содержит 0,05 % проклина; 0,01% метилизотиазолинона; 0,01% бромонитродиоксана; готов к использованию	1 x 12 мл
SeroSC	Субстратный раствор: пероксид водорода / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 12 мл
SeroSC	Стоп-реагент: 0,5 М раствор серной кислоты	1 x 12 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Следует избегать микробной контаминации. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек. Разведенный промывочный буфер можно хранить при температуре 2-8 °С до срока годности, указанного на этикетке флакона.

Перед использованием температура всех реагентов и стрипов должна быть доведена до комнатной температуры. Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов, не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной. Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застежку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °С.

Необходимо избегать контакта субстрата с раствором конъюгата, поскольку это приводит к окрашиванию субстрата. Субстрат бесцветен; его также следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел голубую окраску, он становится непригодным.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Влажная камера с температурой 37 °С
- Пробирки для разведения образцов
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 10-100 мкл и 100-1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага
- Таймер
- Контейнер для утилизации отходов с 0,5% раствором гипохлорита натрия

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.

- Контрольные сыворотки (положительный и отрицательный контроль) были проверены на антитела к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также антиген гепатита В; при этом показали отрицательные результаты. Однако, как контроли, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Не следует пипетировать ртом образцы или реагенты, необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Положительный контроль и раствор для разведения образцов содержат 0,01% мертиолята (тимерозала) в качестве консерванта. Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
- Промывочный буфер содержит 0,2% Бронидокс-Л в качестве консерванта. Избегайте его контакта с кожей и слизистыми.
- Пероксид может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C по меньшей мере в течение одного часа.
- **ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Bordetella IgA предназначена для исследования образцов сыворотки крови человека. После взятия крови необходимо как можно скорее отделить сгусток во избежание гемолиза. Образцы следует хранить в холодильнике или в замороженном виде до момента исследования. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, подвергшихся тепловой обработке, липемических, гемолизированных, иктеричных и мутных, может привести к получению неверных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразбавленная сыворотка		Разбавленная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	более одной недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите температуру всех реагентов и стрипов до комнатной температуры в течение не менее 30 минут. Не извлекайте стрипы из упаковки до того, как они прогреются до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Сразу после использования набор необходимо поместить на хранение при температуре 2-8 °C. Отбирайте только необходимое для анализа количество реагентов. Не выливайте оставшиеся реагенты обратно во флаконы, чтобы не допустить контаминации. Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы.

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Bordetella IgA для серологического определения IgA-антител содержит несколько реагентов, независимых от проводимых тестов. Эти реагенты имеют этикетки RIDASCREEN® Sero (SeroWP, SeroPP, SeroA HD, SeroSC, SeroStop). Они неспецифичны только для данного набора и могут быть взаимозаменяемы реагентами из других наборов, имеющими такие же этикетки. **Это не относится к контролям.**

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера (RIDASCREEN® SeroWP) разведите в 9 частях дистиллированной воды. Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C.

Внесите 100 мл концентрированного промывочного буфера в мерный цилиндр объемом 1000 мл. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой. Готовый промывочный буфер можно хранить при температуре 2-8 °C в течение срока годности набора, указанного на этикетке флакона.

9.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите образцы сыворотки крови буфером для разведения образцов (RIDASCREEN® SeroPP) 1 : 100. Разводить образцы сывороток для определения IgA-антител можно, например, следующим образом: 10 мкл образца сыворотки крови + 990 мкл буфера для разведения образцов **SeroPP**.

Внимание! Отрицательный контроль и стандартный контроль, входящие в состав набора, готовы к использованию и не требуют разведения.

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку планшета необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 100 мкл разведенных образцов сыворотки крови или готовых к использованию контролей (кроме лунки A1, предназначенной для измерения реагентного бланка). В каждом анализе следует отводить одну лунку для отрицательного контроля и две лунки для стандартного контроля. Закройте планшет и инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °С. Дно камеры не должно соприкасаться с материалами, хорошо проводящими тепло (металлом или влажной бумагой).

A1	бланк
B1	отрицательный контроль
C1	стандартный контроль
D1	стандартный контроль
E1, F1	образцы сывороток крови пациентов 1, 2 и т.д.

Внимание!

При проведении иммуноферментного анализа нельзя ставить планшет в холодную инкубационную камеру, температура в которой будет повышаться до 37 °С во время инкубации. Температура в камере уже должна быть доведена до 37 °С к началу инкубации.

9.5. Промывка

Вылейте или аспирируйте содержимое лунок в пустой контейнер с дезинфицирующим раствором. Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Затем промойте все лунки 4 раза, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следите за тем, чтобы промывочное устройство подходило для планшетов этого типа.

9.6. Вторая инкубация

В каждую лунку (включая A1) внесите по 100 мкл RIDASCREEN® Sero A HD (конъюгата антител к IgA человека). Закройте планшет и инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °С.

9.7. Промывка

Промойте планшет 4 раза как описано в пункте 9.5.

9.8. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 100 мкл RIDASCREEN® SeroSC. Закройте планшет и инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37°С. По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл RIDASCREEN® SeroStop. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках с помощью планшетного спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм). Фоновое значение поглощения измеряется против бланка (лунка A1).

Примечание:

Перед измерением протрите дно микропланшета, чтобы удалить влагу.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества стандартный контроль (в дубликатах) и отрицательный контроль должны включаться в каждую серию определений. Считается, что тест был проведен правильно, если среднее значение ОП для стандартного контроля, измеренное при 450/620 нм, попадает в диапазон заданных значений (см. прилагаемую к набору листовку-вкладыш). Если результаты двух отдельных измерений отклоняются от среднего значения более чем на 20%, тест необходимо повторить. Величина ОП для отрицательного контроля должна составлять $<0,3$.

Отклонение указанных величин от установленных, помутнение реагентов или посинение субстрата еще до добавления в лунки – указывают на истечение срока годности реагентов.

Прежде чем повторять анализ, пожалуйста, проверьте следующее:

- срок годности реагентов
- функциональность используемого оборудования (например, проведите калибрование)
- правильность выполнения процедуры анализа

- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел синюю окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после повторного анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

11. ОЦЕНКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Анализ полученных данных может быть проведен тремя разными путями:

1. С использованием прилагающейся стандартной кривой.
2. С использованием табличных значений (см. прилагающийся сопроводительный лист).
3. Математическим путем с использованием 4-параметрического метода вычислений или α -метода.

До проведения анализа данных необходимо из всех значений ОП вычесть значение ОП бланка (лунки A1).

Если необходимо провести анализ с использованием калибровочной кривой, обязательно следует вводить в тест стандартный контроль в дублях с тем, чтобы скорректировать вариабельность между измерениями, выполненными в разные дни. Для данного целевого значения стандартного контроля и значения стандартного контроля, полученного в тесте, вычисляется фактор коррекции F. Целевое значение для данной серии приводится в прилагающемся сопроводительном листе.

$$F = \frac{\text{целевое значение стандартного контроля}}{\text{значение средней оптической плотности стандартного контроля}}$$

Все значения ОП образцов следует умножить на фактор F. По этим скорректированным значениям находят соответствующие значения в Ед/мл, вычисленные по калибровочной кривой для данной серии.

11.2. Анализ табличных данных

Исходя из среднего значения оптической плотности стандартного контроля определяют колонку диапазонов значений в прилагаемой таблице значений. Этой колонкой следует пользоваться при определении уровня антител в исследуемых пробах. В этой колонке измеренные значения оптической плотности образца классифицированы по диапазонам оптических плотностей, а соответствующие им титры антител в Ед/мл приведены во второй колонке слева.

	Ед/мл	Диапазон оптических плотностей стандартного контроля
		0,85 – 0,90
-	< 14,0	< 0,42
?	14,0 – 18,0	0,42 – 0,54
	18,1 – 30,0	0,55 – 0,76
	30,1 – 50,0	0,77 – 1,04
+	50,1 – 100,0	1,05 – 1,45
	100,1 – 200,0	1,46 – 1,84
	> 200,0	> 1,84

Рис. 1. Пример определения концентрации антител класса IgG (выдержка из прилагающегося к данной серии сопроводительного листа).

Например, среднее значение оптической плотности стандартного контроля в данном тесте составило 0,89. В таком случае для определения уровня антител в исследуемых пробах следует использовать колонку с диапазоном значений оптических плотностей от 0,85 до 0,90. Предположим, оптическая плотность образца сыворотки крови пациента составила 0,65 (диапазон значений ОП 0,55 – 0,76). Тогда титр антител класса IgG будет в пределах от 18,1 до 30,0 Ед/мл. (Приведенные значения даны в качестве образца и могут отличаться от реальных значений из прилагающегося к данной серии сопроводительного листа).

Качественная оценка результатов определения – положительная (+), отрицательная (-), неопределенная (?) – может быть взята из первой колонки таблицы значений в прилагающемся к данной серии сопроводительном листе.

11.3. Математические расчеты

Необходимые значения для математического анализа с использованием 4-параметрического метода вычислений или α -метода приведены в прилагающемся сопроводительном листе.

11.4. Интерпретация результатов

Таблица 3. Оценка уровней антител (в Ед/мл).

	IgA
отрицательный	< 19 Ед/мл
неопределенный	19 – 26 Ед/мл
положительный	> 26 Ед/мл

12. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Bordetella IgA предназначена для определения антител класса IgA к *B. pertussis*. Также определяются антитела к *Bordetella parapertussis*. Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клинической картиной.

Отрицательный результат в целом не исключает инфицирование *Bordetella*. Из-за низкого титра антител на начальной стадии заболевания результат теста, проведенного в этот период, может быть отрицательным. Если имеется подозрение на наличие данной инфекции, исходя из клинических данных, следует провести анализ другого образца сыворотки крови этого пациента через две недели.

Для оценки состояния пациента в сыворотке крови следует определять все три класса иммуноглобулинов одновременно. Для постановки более точного диагноза необходимо исследовать два последовательно взятых образца сыворотки крови пациента.

Обнаружение антител класса IgA позволяет сделать заключение о возможной колонизации *Bordetella* мембраны слизистых оболочек. Таким образом, высокий титр антител класса IgA свидетельствует о происходящем остром процессе. В некоторых случаях заметные титры антител IgA могут сохраняться в течение длительного периода времени.

Положительный результат на наличие антител к *Bordetella IgA* не исключает присутствия в образце других патогенов.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4. Вариация между постановками.

Вариация между постановками (n=5)	IgA	
	ОП	CV, %
Сыворотка 1	0,246	6,8
Сыворотка 2	0,592	6,0
Сыворотка 3	1,214	4,4

Таблица 5. Вариация внутри постановок.

Вариация внутри постановки (n=24)	IgA	
	ОП	CV, %
Сыворотка 1	0,223	3,7
Сыворотка 2	0,579	2,5
Сыворотка 3	1,280	3,9

Таблица 6. Чувствительность и специфичность оценивали по сравнению с двумя другими коммерчески доступными наборами ИФА.

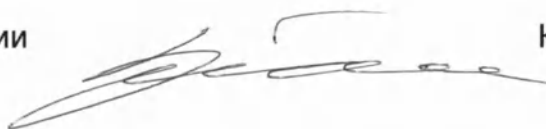
	IgA
Чувствительность	83,3%
Специфичность	100,0%

Таблица 7. Результаты исследования 212 образцов сыворотки доноров крови, взятых из центра донорства крови Германии.

Образцы сыворотки 212 доноров крови	IgA
Отрицательный	92,0%
Неоднозначный	3,3%
Положительный	4,7%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

М.И. Прищепа

16 мая 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения IgG антител к бордетелла пертуссис
(RIDASCREEN® Bordetella IgG)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Bordetella IgG

Иммуноферментный тест для качественного и полуколичественного определения антител классов IgG к возбудителю коклюша *Bordetella pertussis* в сыворотке крови человека

Набор для определения антител класса IgG

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест RIDASCREEN® Bordetella IgG – диагностическая *in vitro* иммуноферментная (ИФА) тест-система для выявления антител классов IgG к возбудителю коклюша *Bordetella pertussis* в сыворотке крови человека.

2. ВВЕДЕНИЕ

В результате инфекции *Bordetella pertussis* происходит формирование специфических антител к патогену, определение которых в сыворотке крови возможно с помощью иммунологических методов. Выбор метода и определяемых патоген-специфичных антител имеет важное значение для диагностики. Для диагностики острой формы коклюша с обнаружением антител разработан тест фиксации комплемента, однако он обладает слишком низкой чувствительностью. Между тем, с внедрением технологии иммуноферментного анализа с его возможностью дифференцировать отдельные классы иммуноглобулинов, стал доступен чувствительный и быстрый метод определения острых инфекций. Это особенно важно на ранних стадиях развития заболевания из-за высокой инфекционности и неспецифических клинических проявлений в этот период.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител классов IgG к *B. pertussis* основано на двухстадийном непрямом иммуноферментном анализе. Очищенные специфические антигены *B. pertussis* сорбированы на поверхности лунок микропланшета. В лунки вносят разведенные образцы сыворотки крови и контроли и инкубируют при температуре 37 °C во влажной камере. Имеющиеся в них антитела, специфичные к *Bordetella*, связываются с иммобилизованными антигенами. Несвязавшиеся антитела удаляются промывкой. На второй стадии в лунки вносят конъюгированные с пероксидазой антитела к IgG человека. После инкубации несвязавшийся конъюгат удаляется промывкой. В лунки добавляют субстрат и инкубируют при температуре 37 °C во влажной камере. Фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат/хромоген в голубую жидкость. Добавление стоп-реагента меняет ее цвет на желтый. Оптическую плотность измеряют при длине волны 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: в рамке-держателе, состоящий из двенадцати отделяемых 8-луночных стрипов, покрытых токсином пертуссис/гемагглютинин; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 лунок
SeroPP	Буфер для разведения образцов: фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,01% тимерозал (мертиолят) и 0,05% Твин 20; желтого цвета; готов к использованию	1 x 110 мл
SeroWP	Промывочный буфер: 10x концентрат; трис-буфер; содержит 0,2% бренидокс-Л и 0,5% Твин 20	1 x 100 мл
Control IgG+	Стандартный контроль IgG: разведенная человеческая сыворотка с IgG человека; синего цвета; содержит 0,01% тимерозал и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 2,5 мл
Control IgG -	Отрицательный контроль IgG: разведенная человеческая сыворотка, не содержащая IgG человека; содержит 0,01% тимерозал и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 1,2 мл
SeroG HD зеленого цвета	Ферментный конъюгат IgG: антитела кролика к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; в стабилизирующем белковом растворе; готов к использованию; содержит 0,05 % проклина; 0,01% метилизотиазолинона; 0,01% бромонитродидоксана	1 x 12 мл
SeroSC	Субстратный раствор: пероксид водорода / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 12 мл
SeroStop	Стоп-реагент: 0,5 М раствор серной кислоты	1 x 12 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Следует избегать микробной контаминации. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек. Разведенный промывочный буфер можно хранить при температуре 2-8 °С до срока годности, указанного на этикетке флакона.

Перед использованием температура всех реагентов и стрипов должна быть доведена до комнатной температуры. Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов, не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной. Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застёжку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °С.

Необходимо избегать контакта субстрата с раствором конъюгата, поскольку это приводит к окрашиванию субстрата. Субстрат бесцветен; его также следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел голубую окраску, он становится непригодным.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Влажная камера с температурой 37 °С
- Пробирки для разведения образцов
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 10-100 мкл и 100-1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага
- Таймер
- Контейнер для утилизации отходов с 0,5% раствором гипохлорита натрия

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Контрольные сыворотки (положительный и отрицательный контроль) были проверены на антитела к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также антиген гепатита В; при этом показали отрицательные результаты. Однако, как контроли, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Не следует пипетировать ртом образцы или реагенты, необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Положительный контроль и раствор для разведения образцов содержат 0,01% мертиолята (тимерозала) в качестве консерванта. Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
- Промывочный буфер содержит 0,2% бренидокс-Л в качестве консерванта. Избегайте его контакта с кожей и слизистыми.
- Пероксид может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C по меньшей мере в течение одного часа.
- **ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Bordetella IgG предназначена для исследования образцов сыворотки крови человека. После взятия крови необходимо как можно скорее отделить сгусток во избежание гемолиза. Образцы следует хранить в холодильнике или в замороженном виде до момента исследования. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, подвергшихся тепловой обработке, липемических, гемолизированных, иктеричных и мутных, может привести к получению неверных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразбавленная сыворотка		Разбавленная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	более одной недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите температуру всех реагентов и стрипов до комнатной температуры в течение не менее 30 минут. Не извлекайте стрипы из упаковки до того, как они прогреются до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Сразу после использования набор необходимо поместить на хранение при температуре 2-8 °C.

Отбирайте только необходимое для анализа количество реагентов. Не выливайте оставшиеся реагенты обратно во флаконы, чтобы не допустить контаминации.

Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы.

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Bordetella IgG для серологического определения антител содержит несколько реагентов, независимых от проводимых тестов. Эти реагенты имеют этикетки RIDASCREEN® Sero (SeroWP, SeroPP, Sero G HD, SeroSC, SeroStop). Они неспецифичны только для данного набора и могут быть взаимозаменяемы реагентами из других наборов, имеющими такие же этикетки. **Это не относится к контролям.**

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера (RIDASCREEN® SeroWP) разведите в 9 частях дистиллированной воды. Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C.

Внесите 100 мл концентрированного промывочного буфера в мерный цилиндр объемом 1000 мл. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой. Готовый промывочный буфер можно хранить при температуре 2-8 °C в течение срока годности набора, указанного на этикетке флакона.

9.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите образцы сыворотки крови буфером для разведения образцов (RIDASCREEN® SeroPP) 1 : 100.

Разводить образцы сывороток для определения IgG-антител можно, например, следующим образом:

10 мкл образца сыворотки крови + 990 мкл буфера для разведения образцов **SeroPP**

Внимание!

Отрицательный контроль и стандартный контроль, входящие в состав набора, готовы к использованию и не требуют разведения.

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку планшета необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 100 мкл разведенных образцов сыворотки крови или готовых к использованию контролей (кроме лунки A1, предназначенной для измерения реагентного бланка). В каждом анализе следует отводить одну лунку для отрицательного контроля и две лунки для стандартного контроля. Закройте планшет и инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C. Дно камеры не должно соприкасаться с материалами, хорошо проводящими тепло (металлом или влажной бумагой).

A1	бланк
B1	отрицательный контроль
C1	стандартный контроль
D1	стандартный контроль
E1, F1	образцы сывороток крови пациентов 1, 2 и т.д.

Внимание!

При проведении иммуноферментного анализа нельзя ставить планшет в холодную инкубационную камеру, температура в которой будет повышаться до 37 °C во время инкубации. Температура в камере уже должна быть доведена до 37 °C к началу инкубации.

9.5. Промывка

Вылейте или аспирируйте содержимое лунок в пустой контейнер с дезинфицирующим раствором. Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Затем промойте все лунки 4 раза, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следите за тем, чтобы промывочное устройство подходило для планшетов этого типа.

9.6. Вторая инкубация

В каждую лунку (включая A1) внесите по 100 мкл RIDASCREEN® SeroG HD (конъюгата антител к IgG человека). Закройте планшет и инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °C.

9.7. Промывка

Промойте планшет 4 раза как описано в пункте 9.5.

9.8. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 100 мкл RIDASCREEN® SeroSC. Закройте планшет и инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37°C. По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл RIDASCREEN® SeroStop. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках с помощью планшетного спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм). Фоновое значение поглощения измеряется против бланка (лунка A1).

Примечание:

Перед измерением протрите дно микропланшета, чтобы удалить влагу.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества стандартный контроль (в дубликатах) и отрицательный контроль должны включаться в каждую серию определений. Считается, что тест был проведен правильно, если среднее значение ОП для стандартного контроля, измеренное при 450/620 нм, попадает в диапазон заданных значений (см. прилагаемую к набору листовку-вкладыш). Если результаты двух отдельных измерений

отклоняются от среднего значения более чем на 20%, тест необходимо повторить. Величина ОП для отрицательного контроля должна составлять <0,3.

Отклонение указанных величин от установленных, помутнение реагентов или посинение субстрата еще до добавления в лунки – указывают на истечение срока годности реагентов.

Прежде чем повторять анализ, пожалуйста, проверьте следующее:

- срок годности реагентов
- функциональность используемого оборудования (например, проведите калибрование)
- правильность выполнения процедуры анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел синюю окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после повторного анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

11. ОЦЕНКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Анализ полученных данных может быть проведен тремя разными путями:

1. С использованием прилагающейся стандартной кривой.
2. С использованием табличных значений (см. прилагающийся сопроводительный лист).
3. Математическим путем с использованием 4-параметрического метода вычислений или α -метода.

До проведения анализа данных необходимо из всех значений ОП вычесть значение ОП бланка (лунки A1).

Если необходимо провести анализ с использованием калибровочной кривой, обязательно следует вводить в тест стандартный контроль в дублях с тем, чтобы скорректировать вариабельность между измерениями, выполненными в разные дни. Для данного целевого значения стандартного контроля и значения стандартного контроля, полученного в тесте, вычисляется фактор коррекции F. Целевое значение для данной серии приводится в прилагающемся сопроводительном листе.

$$F = \frac{\text{целевое значение стандартного контроля}}{\text{значение средней оптической плотности стандартного контроля}}$$

Все значения ОП образцов следует умножить на фактор F. По этим скорректированным значениям находят соответствующие значения в Ед/мл, вычисленные по калибровочной кривой для данной серии.

11.2. Анализ табличных данных

Исходя из среднего значения оптической плотности стандартного контроля определяют колонку диапазонов значений в прилагаемой таблице значений. Этой колонкой следует пользоваться при определении уровня антител в исследуемых пробах. В этой колонке измеренные значения оптической плотности образца классифицированы по диапазонам оптических плотностей, а соответствующие им титры антител в Ед/мл приведены во второй колонке слева.

	Ед/мл	Диапазон оптических плотностей стандартного контроля
		0,85 – 0,90
-	< 14,0	< 0,42
?	14,0 – 18,0	0,42 – 0,54
	18,1 – 30,0	0,55 – 0,76
	30,1 – 50,0	0,77 – 1,04
+	50,1 – 100,0	1,05 – 1,45
	100,1 – 200,0	1,46 – 1,84
	> 200,0	>1,84

Рис. 1. Пример определения концентрации антител класса IgG (выдержка из прилагающегося к данной серии сопроводительного листа)

Например, среднее значение оптической плотности стандартного контроля в данном тесте составило 0,89. В таком случае для определения уровня антител в исследуемых пробах следует использовать колонку с диапазоном значений оптических плотностей от 0,85 до 0,90. Предположим, оптическая плотность образца сыворотки крови пациента составила 0,65 (диапазон значений ОП 0,55 – 0,76). Тогда титр антител класса

IgG будет в пределах от 18,1 до 30,0 Ед/мл. (Приведенные значения даны в качестве образца и могут отличаться от реальных значений из прилагающегося к данной серии сопроводительного листа).

Качественная оценка результатов определения – положительная (+), отрицательная (-), неопределенная (?) – может быть взята из первой колонки таблицы значений в прилагающемся к данной серии сопроводительном листе.

11.3. Математические расчеты

Необходимые значения для математического анализа с использованием 4-параметрического метода вычислений или α -метода приведены в прилагающемся сопроводительном листе.

11.4. Интерпретация результатов

Таблица 3. Оценка уровней антител (в Ед/мл).

	IgG
отрицательный	< 14 Ед/мл
неопределенный	14 – 18 Ед/мл
положительный	> 18 Ед/мл

12. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Bordetella IgG предназначена для определения антител класса IgG к *B. pertussis*. Также определяются антитела к *Bordetella parapertussis*. Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клинической картиной.

Отрицательный результат в целом не исключает инфицирование *Bordetella*. Из-за низкого титра антител на начальной стадии заболевания результат теста, проведенного в этот период, может быть отрицательным. Если имеется подозрение на наличие данной инфекции, исходя из клинических данных, следует провести анализ другого образца сыворотки крови этого пациента через две недели.

Для оценки состояния пациента в сыворотке крови следует определять все три класса иммуноглобулинов одновременно. Для постановки более точного диагноза необходимо исследовать два последовательно взятых образца сыворотки крови пациента.

Положительный результат на наличие антител к *Bordetella IgG* не исключает присутствия в образце других патогенов.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4. Вариация между постановками.

Вариация между постановками (n=5)	IgG	
	ОП	CV, %
Сыворотка 1	0,229	4,2
Сыворотка 2	0,539	7,5
Сыворотка 3	1,123	10,7

Таблица 5. Вариация внутри постановок.

Вариация внутри постановки (n=24)	IgG	
	ОП	CV, %
Сыворотка 1	0,368	2,8
Сыворотка 2	1,330	3,8
Сыворотка 3	2,717	2,7

Таблица 6. Чувствительность и специфичность оценивали по сравнению с двумя другими коммерчески доступными наборами ИФА.

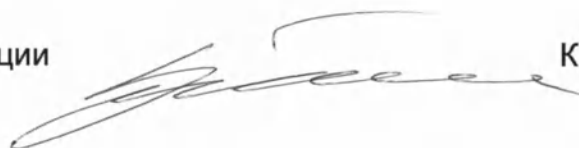
	IgG
Чувствительность	90,2%
Специфичность	100,0%

Таблица 7. Результаты исследования 212 образцов сыворотки доноров крови, взятых из центра донорства крови Германии.

Образцы сыворотки 212 доноров крови	IgG
Отрицательный	68,4%
Неоднозначный	9,4%
Положительный	22,2%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»М.И. Прищепа
«10» ноября 2009 г.**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

**Набор реагентов для определения IgM антител к бордетелла пертуссис
(RIDASCREEN® Bordetella IgM)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)**

RIDASCREEN® Bordetella IgM

Иммуноферментный тест для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM к возбудителю коклюша *Bordetella pertussis* в сыворотке крови человека

Набор для определения антител класса IgM**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Тест RIDASCREEN® Bordetella IgM – диагностическая *in vitro* иммуноферментная (ИФА) тест-система для выявления антител класса IgM к возбудителю коклюша *Bordetella pertussis* в сыворотке крови человека.

2. ВВЕДЕНИЕ

В результате инфекции *Bordetella pertussis* происходит формирование специфических антител к патогену, определение которых в сыворотке крови возможно с помощью иммунологических методов. Выбор метода и определяемых патоген-специфичных антител имеет важное значение для диагностики. Для диагностики острой формы коклюша с обнаружением антител разработан тест фиксации комплемента, однако он обладает слишком низкой чувствительностью. Между тем, с внедрением технологии иммуноферментного анализа с его возможностью дифференцировать отдельные классы иммуноглобулинов, стал доступен чувствительный и быстрый метод определения острых инфекций. Это особенно важно на ранних стадиях развития заболевания из-за высокой инфекционности и неспецифических клинических проявлений в этот период.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител классов IgM к *B. pertussis* основано на двухстадийном непрямом иммуноферментном анализе. Очищенные специфические антигены *B. pertussis* сорбированы на поверхности лунок микропланшета. В лунки вносят разведенные образцы сыворотки крови и контроли и инкубируют при температуре 37 °C во влажной камере. Имеющиеся в них антитела, специфичные к *Bordetella*, связываются с иммобилизованными антигенами. Несвязавшиеся антитела удаляются промывкой. На второй стадии в лунки вносят конъюгированные с пероксидазой антитела к IgM человека. После инкубации несвязавшийся конъюгат удаляется промывкой. В лунки добавляют субстрат и инкубируют при температуре 37 °C во влажной камере. Фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат/хромоген в голубую жидкость. Добавление стоп-реагента меняет ее цвет на желтый. Оптическую плотность измеряют при длине волны 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: в рамке-держателе, состоящий из двенадцати отделяемых 8-луночных стрипов, покрытых общим антигеном (IgM) <i>Bordetella pertussis</i> ; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 лунок
SeroPP	Буфер для разведения образцов: фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,01% тимерозал (мертиолят) и 0,05% Твин 20; желтого цвета; готов к использованию	1 x 110 мл
SeroWP	Промывочный буфер: 10x концентрат; трис-буфер; содержит 0,2% бромидокс-Л и 0,5% Твин 20	1 x 100 мл
Control IgM+	Стандартный контроль IgM: разведенная человеческая сыворотка с IgM человека; синего цвета; содержит 0,01% мертиолят (тимерозал) и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 2,5 мл
Control IgM -	Отрицательный контроль IgM: разведенная человеческая сыворотка, не содержащая IgM человека; содержит 0,01% мертиолят (тимерозал) и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 1,2 мл
SeroM HD красного цвета	Ферментный конъюгат IgM : антитела кролика к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; стабилизирующий белковый раствор; содержит 0,05 % проклина; 0,01% метилизотиазолинона; 0,01% бромонитродоксиана; готов к использованию	1 x 12 мл
SeroSC	Субстратный раствор: пероксид водорода / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 12 мл
SeroStop	Стоп-реагент: 0,5 М раствор серной кислоты	1 x 12 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Следует избегать микробной контаминации. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек. Разведенный промывочный буфер можно хранить при температуре 2-8 °C до срока годности, указанного на этикетке флакона.

Перед использованием температура всех реагентов и стрипов должна быть доведена до комнатной температуры. Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов, не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной. Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застежку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °C.

Необходимо избегать контакта субстрата с раствором конъюгата, поскольку это приводит к окрашиванию субстрата. Субстрат бесцветен; его также следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел голубую окраску, он становится непригодным.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Влажная камера с температурой 37 °C
- Пробирки для разведения образцов
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 10-100 мкл и 100-1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага
- Таймер
- Контейнер для утилизации отходов с 0,5% раствором гипохлорита натрия

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.

- Контрольные сыворотки (положительный и отрицательный контроль) были проверены на антитела к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также антиген гепатита В; при этом показали отрицательные результаты. Однако, как контроли, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Не следует пипетировать ртом образцы или реагенты, необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Положительный контроль и раствор для разведения образцов содержат 0,01% мертиолята (тимерозала) в качестве консерванта. Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
- Промывочный буфер содержит 0,2% брioniдекс-Л в качестве консерванта. Избегайте его контакта с кожей и слизистыми.
- Пероксид может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C по меньшей мере в течение одного часа.
- **ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоты, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Bordetella IgM предназначена для исследования образцов сыворотки крови человека. После взятия крови необходимо как можно скорее отделить сгусток во избежание гемолиза. Образцы следует хранить в холодильнике или в замороженном виде до момента исследования. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, подвергшихся тепловой обработке, липемических, гемолизированных, иктеричных и мутных, может привести к получению неверных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразбавленная сыворотка		Разбавленная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	более одной недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите температуру всех реагентов и стрипов до комнатной температуры в течение не менее 30 минут. Не извлекайте стрипы из упаковки до того, как они прогреются до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Сразу после использования набор необходимо поместить на хранение при температуре 2-8 °C.

Отбирайте только необходимое для анализа количество реагентов. Не выливайте оставшиеся реагенты обратно во флаконы, чтобы не допустить контаминации.

Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы.

Иммуноферментные тест-системы RIDASCREEN® для серологического определения антител содержат несколько реагентов, независимых от проводимых тестов. Эти реагенты имеют этикетки RIDASCREEN® Sero (SeroWP, SeroPP, SeroM HD, SeroSC, SeroStop). Они неспецифичны только для данного набора и могут быть взаимозаменяемы реагентами из других наборов, имеющими такие же этикетки. **Это не относится к контролям.**

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера (RIDASCREEN® SeroWP) разведите в 9 частях дистиллированной воды. Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C.

Внесите 100 мл концентрированного промывочного буфера в мерный цилиндр объемом 1000 мл. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой. Готовый промывочный буфер можно хранить при температуре 2-8 °C в течение срока годности набора, указанного на этикетке флакона.

9.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите образцы сыворотки крови буфером для разведения образцов (RIDASCREEN® SeroPP) 1 : 100.

Разводить образцы сывороток для определения IgM-антител можно, например, следующим образом:

10 мкл образца сыворотки крови + 990 мкл буфера для разведения образцов **SeroPP**

Для определения антител класса IgM сыворотки перед проведением теста необходимо обработать абсорбентом антител класса IgG (например, RIDA® RF-Absorbens, номер по каталогу Z0202). После этого образцы сывороток разводят до конечного разведения 1 : 100 буфером для разведения образцов.

Внимание!

Отрицательный контроль и стандартный контроль, входящие в состав набора, готовы к использованию и не требуют разведения.

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку планшета необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 100 мкл разведенных образцов сыворотки крови или готовых к использованию контролей (кроме лунки A1, предназначенной для измерения реагентного бланка). В каждом анализе следует отводить одну лунку для отрицательного контроля и две лунки для стандартного контроля. Закройте планшет и инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °С. Дно камеры не должно соприкасаться с материалами, хорошо проводящими тепло (металлом или влажной бумагой).

A1	бланк
B1	отрицательный контроль
C1	стандартный контроль
D1	стандартный контроль
E1, F1	образцы сывороток крови пациентов 1, 2 и т.д.

Внимание!

При проведении иммуноферментного анализа нельзя ставить планшет в холодную инкубационную камеру, температура в которой будет повышаться до 37 °С во время инкубации. Температура в камере уже должна быть доведена до 37 °С к началу инкубации.

9.5. Промывка

Вылейте или аспирируйте содержимое лунок в пустой контейнер с дезинфицирующим раствором. Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Затем промойте все лунки 4 раза, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следите за тем, чтобы промывочное устройство подходило для планшетов этого типа.

9.6. Вторая инкубация

В каждую лунку (включая A1) внесите по 100 мкл RIDASCREEN® SeroM HD (конъюгата антител к IgM человека). Закройте планшет и инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °С.

9.7. Промывка

Промойте планшет 4 раза как описано в пункте 9.5.

9.8. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 100 мкл RIDASCREEN® SeroSC. Закройте планшет и инкубируйте в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37°С. По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл RIDASCREEN® SeroStop. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках с помощью планшетного спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм). Фоновое значение поглощения измеряется против бланка (лунка A1).

Примечание:

Перед измерением протрите дно микропланшета, чтобы удалить влагу.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества стандартный контроль (в дубликатах) и отрицательный контроль должны включаться в каждую серию определений. Считается, что тест был проведен правильно, если среднее значение ОП для стандартного контроля, измеренное при 450/620 нм, попадает в диапазон заданных значений (см. прилагаемую к набору листовку-вкладыш). Если результаты двух отдельных измерений отклоняются от среднего значения более чем на 20%, тест необходимо повторить. Величина ОП для отрицательного контроля должна составлять $<0,3$.

Отклонение указанных величин от установленных, помутнение реагентов или посинение субстрата еще до добавления в лунки – указывают на истечение срока годности реагентов.

Прежде чем повторять анализ, пожалуйста, проверьте следующее:

- срок годности реагентов
- функциональность используемого оборудования (например, проведите калибрование)
- правильность выполнения процедуры анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел синюю окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после повторного анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

11. ОЦЕНКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Анализ полученных данных может быть проведен тремя разными путями:

1. С использованием прилагающейся стандартной кривой.
2. С использованием табличных значений (см. прилагающийся сопроводительный лист).
3. Математическим путем с использованием 4-параметрического метода вычислений или α -метода.

До проведения анализа данных необходимо из всех значений ОП вычесть значение ОП бланка (лунки A1).

Если необходимо провести анализ с использованием калибровочной кривой, обязательно следует вводить в тест стандартный контроль в дублях с тем, чтобы скорректировать вариабельность между измерениями, выполненными в разные дни. Для данного целевого значения стандартного контроля и значения стандартного контроля, полученного в тесте, вычисляется фактор коррекции F. Целевое значение для данной серии приводится в прилагающемся сопроводительном листе.

$$F = \frac{\text{целевое значение стандартного контроля}}{\text{значение средней оптической плотности стандартного контроля}}$$

Все значения ОП образцов следует умножить на фактор F. По этим скорректированным значениям находят соответствующие значения в Ед/мл, вычисленные по калибровочной кривой для данной серии.

11.2. Анализ табличных данных

Исходя из среднего значения оптической плотности стандартного контроля определяют колонку диапазонов значений в прилагаемой таблице значений. Этой колонкой следует пользоваться при определении уровня антител в исследуемых пробах. В этой колонке измеренные значения оптической плотности образца классифицированы по диапазонам оптических плотностей, а соответствующие им титры антител в Ед/мл приведены во второй колонке слева.

	Ед/мл	Диапазон оптических плотностей стандартного контроля
		0,85 – 0,90
-	< 14,0	< 0,42
?	14,0 – 18,0	0,42 – 0,54
	18,1 – 30,0	0,55 – 0,76
	30,1 – 50,0	0,77 – 1,04
+	50,1 – 100,0	1,05 – 1,45
	100,1 – 200,0	1,46 – 1,84
	> 200,0	> 1,84

Рис. 1. Пример определения концентрации антител класса IgG (выдержка из прилагающегося к данной серии сопроводительного листа)

Например, среднее значение оптической плотности стандартного контроля в данном тесте составило 0,89. В таком случае для определения уровня антител в исследуемых пробах следует использовать колонку с диапазоном значений оптических плотностей от 0,85 до 0,90. Предположим, оптическая плотность образца сыворотки крови пациента составила 0,65 (диапазон значений ОП 0,55 – 0,76). Тогда титр антител класса IgG будет в пределах от 18,1 до 30,0 Ед/мл. (Приведенные значения даны в качестве образца и могут отличаться от реальных значений из прилагающегося к данной серии сопроводительного листа).

Качественная оценка результатов определения – положительная (+), отрицательная (-), неопределенная (?) – может быть взята из первой колонки таблицы значений в прилагающемся к данной серии сопроводительном листе.

11.3. Математические расчеты

Необходимые значения для математического анализа с использованием 4-параметрического метода вычислений или α -метода приведены в прилагающемся сопроводительном листе.

11.4. Интерпретация результатов**Таблица 3.** Оценка уровней антител (в Ед/мл).

	IgM
отрицательный	< 11 Ед/мл
неопределенный	11 – 17 Ед/мл
положительный	> 17 Ед/мл

12. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Bordetella IgM предназначена для определения антител класса IgM к *B. pertussis*. Также определяются антитела к *Bordetella parapertussis*. Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клинической картиной.

Отрицательный результат в целом не исключает инфицирование *Bordetella*. Из-за низкого титра антител на начальной стадии заболевания результат теста, проведенного в этот период, может быть отрицательным. Если имеется подозрение на наличие данной инфекции, исходя из клинических данных, следует провести анализ другого образца сыворотки крови этого пациента через две недели.

Для оценки состояния пациента в сыворотке крови следует определять все три класса иммуноглобулинов одновременно. Для постановки более точного диагноза необходимо исследовать два последовательно взятых образца сыворотки крови пациента.

Антитела класса IgM обычно выявляются только на первой стадии заболевания. Но наблюдались и случаи устойчивого сохранения титра антител класса IgM.

Положительный результат на наличие антител к *Bordetella* не исключает присутствия в образце других патогенов.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Таблица 4.** Вариация между постановками.

Вариация между постановками (n=5)	IgM	
	ОП	CV, %
Сыворотка 1	0,046	9,9
Сыворотка 2	0,306	11,2
Сыворотка 3	0,859	4,6

Таблица 5. Вариация внутри постановок.

Вариация внутри постановки (n=24)	IgM	
	ОП	CV, %
Сыворотка 1	0,045	8,4
Сыворотка 2	0,268	5,9
Сыворотка 3	0,890	5,2

Таблица 6. Чувствительность и специфичность оценивали по сравнению с двумя другими коммерчески доступными наборами ИФА.

	IgM
Чувствительность	100,0%
Специфичность	100,0%

Таблица 7. Результаты исследования 212 образцов сыворотки доноров крови, взятых из центра донорства крови Германии.

Образцы сыворотки 212 доноров крови	IgM
Отрицательный	100,0%
Неоднозначный	0,0%
Положительный	0,0%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.





ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения IgA антител к кандида альбиканс
(RIDASCREEN® Candida IgA)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Candida IgA

Иммуноферментный тест для полуколичественного определения антител класса IgA к *Candida albicans* и антигенно-близких видов в сыворотке крови человека

Набор на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Для диагностического использования *in vitro*. Набор реагентов RIDASCREEN® Candida IgA является иммуноферментной тест-системой для полуколичественного определения антител класса IgA к *Candida albicans* и антигенно близких видов в сыворотке крови человека. Его следует использовать как подтверждающий тест при подозрении на кандидозную инфекцию или при уточнении иммунного статуса.

2. ВВЕДЕНИЕ

После начала инфекции в результате ответа иммунной системы в организме формируются специфические антитела к патогену. С помощью иммунологических методов можно проводить определение антител в сыворотке крови. При этом значимость теста определяется как используемым методом тестирования, так и выбором антигена, специфичного для патогена. Так, данный ИФА может дифференцировать индивидуальные иммуноглобулины человека, с его помощью можно сделать более точные заключения об иммунологическом статусе пациента, чем основываясь на других серологических методах (таких как геммаглютинационный ингибиторный тест или тест с реакцией фиксации комплемента).

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест RIDASCREEN® Candida IgA основан на твердофазном «сэндвич»-методе иммуноферментного анализа (ИФА). В лунках полистиролового микропланшета сорбированы очищенные антигены кандиды. Специфические антитела, присутствующие в образце пациента, связываются с антигенами и определяются во время второй стадии инкубации с использованием меченых ферментом антител к индивидуальным иммуноглобулинам человека (конъюгат). В лунки добавляют раствор субстрата. Фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат (H_2O_2 /ТМБ) в конечный продукт синего цвета. Ферментативную реакцию останавливают добавлением серной кислоты (стоп-реагент), при этом цвет смеси меняется с синего на желтый. Конечное измерение оптической плотности производится на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм, с использованием референтной длины волны ≥ 620 нм).

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: 96-луночный, разделяемый на двенадцать 8-луночных стрипов, в рамке-держателе, с адсорбированным антигеном <i>C. Albicans</i> ; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
SeroPP	Буфер для разведения образцов: фосфатно-буферный раствор NaCl; желтого цвета; содержит 0,01% тимерозал (мертиолят) и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 110 мл
SeroWP	Промывочный буфер: 10x концентрат; трис-солевой буфер; содержит 0,2% бромидокс-Л и 0,5% Твин 20	1 x 100 мл
Control IgA + синяя крышка	Стандартный контроль IgA: разведенная сыворотка человека с IgA человека; синего цвета; содержит 0,01% тимерозал и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 2,5 мл
Control IgA - бесцветная крышка	Отрицательный контроль IgA: разведенная сыворотка человека; содержит 0,01% тимерозал и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 1,2 мл
SeroA HD синяя крышка	Ферментный конъюгат IgA: антитела кролика к IgA человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; стабилизирующий белковый раствор; содержит 0,05 % проклина 300; 0,01% метилизотиазолинона; 0,01% бромнитродидоксана; готов к использованию	1 x 12 мл
SeroSC	Субстратный раствор: пероксид водорода / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 12 мл
SeroStop	Стоп-реагент: 0,5 М серная кислота; готов к использованию	1 x 12 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Все реагенты необходимо хранить при температуре 2-8 °С и использовать только до истечения срока годности, указанного на этикетках флаконов. Разведенный промывочный буфер сохраняется в течение срока годности, указанного на этикетке, в условиях хранения при температуре 2-8 °С. Гарантийные обязательства при несоответствии качества набора не обеспечиваются после истечения срока его годности. Пакет из фольги необходимо открывать с помощью ножниц, не повреждая застежку. Все неиспользованные стрипы уберите снова в пакет из фольги, закройте пакет и храните его при температуре 2-8 °С.

Все реагенты необходимо предохранять от микробной контаминации. Бесцветный раствор субстрата необходимо хранить в защищенном от света месте, чтобы избежать порчи или появления окраски в результате самоокисления.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1. Реагенты

- Дистиллированная или деионизованная вода

6.2. Оборудование

- Влажная камера на 37°C
- Пробирки для анализа
- Вортекс
- Микропипетки на объем 10-100 мкл и 100-1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Таймер
- Прибор для промывания микропланшетов или многоканальные пипетки
- Планшетный фотометр (ридер ИФА) (450 нм, при необходимости дополнительная длина волны сравнения ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага (или любая другая впитывающая бумага, например, бумажные полотенца)
- Контейнер для отходов с 0,5% раствором гипохлорита

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Только для диагностики *in vitro*.

Этот тест должен проводить только хорошо обученный лабораторный персонал. Необходимо строго придерживаться правил работы в медицинских лабораториях и точно следовать инструкции для выполнения тестирования.

Никогда не пипетируйте образцы и реагенты с помощью рта, не допускайте их попадания на кожу и слизистые. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми защитными перчатками. После окончания тестирования тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где работали с образцами пациентов и компонентами набора.

Контрольные сыворотки (стандартный контроль и отрицательный контроль) набора прошли проверку на содержание антител к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на HBsAg, и показали отрицательные результаты. Несмотря на это, с ними следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом, соблюдая такие же меры предосторожности (в соответствии с действующими официальными инструкциями и правилами), как при работе с образцами пациентов и всеми другими материалами, с которыми они контактируют.

Стандартный контроль и отрицательный контроль, а также буфер для разведения образцов содержат 0,01% мертиолят (thimerosal) в качестве консерванта. Это вещество не должно попадать на кожу и слизистые.

Промывочный буфер содержит 0,2 % Бронидокс-Л в качестве консерванта. Избегайте контактов с кожей и слизистыми.

H₂O₂ (субстрат) может вызвать ожоги. Обращайтесь с реагентом с осторожностью.

Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте контактов с кожей и одеждой. При попадании на кожу промойте пораженный участок большим количеством воды.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавировать при 121°C не менее 1 часа. ВНИМАНИЕ: Чтобы избежать образования ядовитых газов, все остатки жидкости, содержащие стоп-реагент, необходимо нейтрализовать перед удалением их в раствор гипохлорита.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Набор RIDASCREEN® Candida IgA разработан для тестирования образцов сыворотки крови человека. После забора крови во избежание гемолиза сыворотку от сгустка следует отделять как можно быстрее. Образцы до анализа следует хранить охлажденными при температуре 2-8°C или замороженными. Не допускайте повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, липемических, гемолизированных, иктерических или мутных может привести к получению ложных результатов.

Таблица 2. Хранение исследуемых образцов

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общая информация

Перед использованием все реагенты и планшеты [Plate] должны прогреться до комнатной температуры (20-25 °C). Стрипы не следует вынимать из фольгированного пакета до тех пор, пока они не прогреются до комнатной температуры. Перед использованием все реагенты необходимо тщательно перемешать. После использования стрипы (в закрытом пакете) и все реагенты следует хранить при 2-8 °C.

Отбирайте только необходимые объемы реагентов для каждой процедуры. Нельзя возвращать реагенты обратно во флаконы, так как при этом есть опасность контаминации реагентов.

Использованные стрипы нельзя анализировать повторно. Нельзя использовать реагенты и стрипы, если их упаковка была повреждена или если флаконы подтекали.

Некоторые реагенты набора не являются специфичными только для данного теста. Реагенты, имеющие пометку [Sero] (а также [SeroPP]) являются универсальными, т.е. могут использоваться также в других ИФА-наборах RIDASCREEN® вместе с соответствующими специфичными реагентами.

Контрольная сыворотка подобрана для каждой серии. Контрольную сыворотку из данного набора нельзя заменять на контрольные сыворотки из аналогичных наборов других серий.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрата промывочного буфера [SeroWP] смешивают с 9 частями дистиллированной воды. Для этого поместите 100 мл концентрата в мерный цилиндр на 1000 мл и доведите объем раствора

дистиллированной водой до 1000 мл. Любые кристаллы, присутствующие в исходном концентрате, перед разведением необходимо растворить прогреванием на водяной бане при 37 °С. Разведенный буфер можно использовать до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона, если он хранится при температуре 2–8 °С.

9.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите предназначенные для исследования образцы сыворотки буфером для разведения образцов **SeroPP**.

Для определения IgA разведите образцы сыворотки 1:1000:

Например: 10 мкл сыворотки + 90 мкл **SeroPP** (разведение 1:10)
 10 мкл разведения 1:10 + 990 мкл **SeroPP** (конечное разведение 1:1000)

Примечание:

Отрицательный контроль и стандартный контроль поставляются готовыми к использованию и поэтому их НЕЛЬЗЯ разводить или проводить абсорбцию.

9.4. Первая инкубация

Вставьте в рамку необходимое количество лунок. Внесите в соответствующие лунки (кроме лунки A1, предназначенной для измерения реagentного бланка) по 100 мкл разведенных сывороток пациентов и по 100 мкл готовых к использованию контролей. Для отрицательного контроля **Control IgA** следует отвести одну лунку, для стандартного контроля **Control IgA** – две лунки (дубликаты). Закройте планшет и инкубируйте при 37 °С в течение 30 минут во влажной камере. Во время этого процесса дно лунок не должно касаться теплопроводных материалов (таких как металлы или влажная бумага). Планшет во время инкубации должен быть закрыт.

Лунка A1	Реагентный бланк
Лунка B1	Отрицательный контроль
Лунка C1	Стандартный контроль
Лунка D1	Стандартный контроль
Лунки E1, F1 и т.д.	Сыворотки пациентов №1, №2 и т.д.

Примечание:

Планшет нельзя помещать в только что включенный инкубатор, который будет разогреваться во время инкубации. Температуру инкубатора необходимо отрегулировать перед работой, она должна составлять 37 °С.

9.5. Промывка

Вытряхните или аспирируйте жидкость из лунок в контейнер для отходов, содержащий дезинфицирующую жидкость (например, раствор гипохлорита). Остатки жидкости удалите, энергично постучав перевернутым планшетом по чистой фильтровальной бумаге (или бумажному полотенцу). После этого планшет промойте 4 раза, каждый раз внося в лунки по 300 мкл промывочного буфера. Следите за полным опорожнением лунок; для этого после каждого цикла промывки постучите перевернутым планшетом по сухому участку бумаги.

Если для промывки применяется автоматическое промывочное устройство, правильно отрегулируйте его для используемого типа планшетов. После промывки удалите остатки жидкости из лунок, энергично постучав перевернутым планшетом по чистому бумажному полотенцу (или фильтровальной бумаге).

9.6. Вторая инкубация

Добавьте в соответствующие лунки (включая лунку A1) по 100 мкл конъюгата **SeroA HD**, **SeroG HD** или **SeroM HD**. Затем закройте планшет и инкубируйте при 37 °С в течение 30 минут во влажной камере (см. пункт 9.4).

9.7. Промывка

Промойте планшет 4 раза, как описано в пункте 9.5.

9.8. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 100 мкл субстрата **SeroSc**. Затем закройте планшет и инкубируйте при 37 °С в течение 30 минут во влажной камере.

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку 100 мкл стоп-реагента **SeroStop**. После тщательного перемешивания (мягкое постукивание по краю планшета) измерьте оптическую плотность (ОП) в лунках при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм) на фотометре для планшетов. Калибруйте реагентный бланк (лунка A1) по нулю фотометра.

Примечание: Перед проведением измерения протрите снаружи досуха дно планшета для удаления сконденсировавшейся влаги.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества стандартный контроль (в дубликатах) и отрицательный контроль должны включаться в каждую серию определений. Считается, что тест был проведен правильно, если среднее значение ОП для стандартного контроля, измеренное при 450/620 нм, попадает в диапазон заданных значений (см. прилагаемую к набору листовку-вкладыш). Если результаты двух отдельных измерений отклоняются от среднего значения более чем на 20%, тест необходимо повторить. Величина ОП для отрицательного контроля должна составлять $<0,3$.

Отклонение указанных величин от установленных, помутнение реагентов или посинение субстрата еще до добавления в лунки – указывают на истечение срока годности реагентов.

Если полученные результаты не укладываются в ожидаемые значения, перед тем как повторить тестирование, проверьте следующие позиции:

- срок годности реагентов
- функциональность используемого оборудования (например, проведите калибрование)
- правильность выполнения процедуры анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел синюю окраску.

Если результаты, полученные для контролей, не соответствуют требованиям даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком продукции R-Biopharm.

11. ОЦЕНКА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Оценку результатов можно проводить тремя различными методами:

1. Используя стандартную кривую, прилагаемую к набору
2. Используя табличные значения (см. прилагаемую к набору листовку-вкладыш)
3. Математическим, используя 4-параметрический метод или ∞ -метод

До оценки результатов из каждого измеренного значения ОП следует вычесть ОП реагентного бланка.

11.1. Оценка с использованием стандартной кривой, прилагаемой к набору

Для оценки результатов с использованием стандартной кривой вначале необходимо средние значения ОП для всех образцов скорректировать по стандартному контролю, чтобы учесть возможные ежедневные флуктуации измеряемых величин. Используя среднюю величину стандартного контроля, полученную в данном анализе, а также заданную величину (target value) стандартного контроля (зависит от партии набора и заносится в прилагаемую листовку-вкладыш), рассчитайте фактор коррекции F по следующей формуле:

$$F = \frac{\text{заданная величина стандартного контроля (target value)}}{\text{средняя величина стандартного контроля данного анализа}}$$

Все измеренные величины ОП для исследуемых образцов умножьте на фактор F и затем (для каждого образца) по стандартной кривой определите концентрацию антител в Ед/мл.

11.2. Оценка с использованием табличных значений

Используя измеренную в данном эксперименте величину ОП стандартного контроля, выберите в таблице столбец с нужным диапазоном значений стандартного контроля. Затем по этому столбцу определите, в какой диапазон значений попадает измеренная в этом же эксперименте ОП для образца пациента. По второму столбцу таблицы определите соответствующий результат образца в Ед/мл, а по первому столбцу – его качественный результат.

	Ед/мл	Диапазон оптических плотностей стандартного контроля 0,86 – 0,90
-	< 5,0	< 0,19
?	5,0 – 7,0	0,19 – 0,26
	7,1 – 12,0	0,27 – 0,42
	12,1 – 25,0	0,43 – 0,75
+	25,1 – 50,0	0,76 – 1,17
	50,1 – 100,0	1,18 – 1,59
	> 100,0	> 1,59

Рис. 1. Пример определения IgG (из листовки-вкладыша к партии набора)

Например, ОП стандартного контроля нескольких измерений составляет 0,89. В этом случае используется столбец таблицы с диапазоном 0,86 – 0,90. Образец пациента с ОП 0,61 в таком случае попадает в диапазон концентраций антител 12,1 – 25,0 Ед/мл. (Приведенную таблицу следует использовать исключительно в качестве образца, значения в ней могут отличаться от данных в реальном листке-вкладыше из набора).

Качественную оценку полученных результатов (положительный (+), отрицательный (-) или неопределенный (?)) следует проводить по первому столбцу таблицы.

11.3. Математическая оценка

Соответствующие величины, необходимые для математической обработки результатов согласно 4-параметрическому методу или α -методу, приведены в прилагаемой листовке-вкладыше.

11.4. Результаты теста

Таблица 3. Оценка определенных единиц

	IgA
Отрицательные	< 14 Ед/мл
Неоднозначные	14 – 20 Ед/мл
Положительные	> 20 Ед/мл

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система RIDASCREEN® Candida IgA позволяет определять антитела класса IgA к *Candida albicans* и антигенно близким видам. Необходимо отметить, что по измеряемым величинам оптической плотности нельзя судить напрямую о степени выраженности клинических симптомов. Результаты анализа всегда следует интерпретировать в совокупности с полной клинической картиной заболевания.

Отрицательный результат теста необязательно означает, что инфекция отсутствует. Из-за низкой концентрации антител на ранних стадиях легко можно сделать неправильный вывод об их отсутствии. В таком случае, если наличие инфекции все же можно предположить на основании клинических наблюдений, тест следует повторить с парной сывороткой (новым образцом, взятым у того же пациента через 2-4 недели).

Два парных образца сыворотки следует всегда брать для серологического тестирования, чтобы улучшить качество диагностического обследования пациента. Для интерпретации наблюдаемой картины очень важно обнаружение возрастающего титра антител.

Наличие антител класса IgA свидетельствует о возможном заселении слизистых мембран. Поэтому сильное увеличение титра IgA-антител указывает на острую колонизацию организма человека. Снижение титра IgA-антител свидетельствует о прошедшей инфекции.

Положительный результат в качестве причины заболевания не исключает наличие другого инфекционного патогена.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Таблица 4.** Вариации результатов, полученных в разных постановках анализа (n = 5).

Вариации в разных постановках анализа	IgA	
	ОП	CV
Сыворотка 1	0,100	10,1%
Сыворотка 2	0,576	3,9%
Сыворотка 3	1,107	5,9%

Таблица 5. Вариации результатов, полученных в одной постановке (n = 24).

Вариации в одной постановке анализа	IgA	
	ОП	CV
Сыворотка 1	0,083	3,5%
Сыворотка 2	0,712	2,9%
Сыворотка 3	1,029	2,5%

Таблица 6. Чувствительность и специфичность, полученные при сравнении с двумя другими коммерческими ИФА-наборами.

	IgA
Чувствительность	100,0%
Специфичность	98,2%

Таблица 7. Результаты тестирования образцов сыворотки 212 доноров крови (из центра донорства крови в Германии).

Образцы сыворотки 212 доноров крови	IgA
Отрицательные	94,3%
Неоднозначные	0,0%
Положительные	5,7%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции

К.И. Бланк



Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»
М.И. Прищепа
«16» ноября 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения IgG антител к кандида альбиканс
(RIDASCREEN® Candida IgG)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Candida IgG

Иммуноферментный тест для полуколичественного определения антител класса IgG к *Candida albicans* и антигенно-близких видов в сыворотке крови человека

Набор на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Для диагностического использования *in vitro*. Набор реагентов RIDASCREEN® Candida IgG является иммуноферментной тест-системой для полуколичественного определения антител класса IgG к *Candida albicans* и антигенно близких видов в сыворотке крови человека. Его следует использовать как подтверждающий тест при подозрении на кандидозную инфекцию или при уточнении иммунного статуса.

2. ВВЕДЕНИЕ

После начала инфекции в результате ответа иммунной системы в организме формируются специфические антитела к патогену. С помощью иммунологических методов можно проводить определение антител в сыворотке крови. При этом значимость теста определяется как используемым методом тестирования, так и выбором антигена, специфичного для патогена. Так, данный ИФА может дифференцировать индивидуальные иммуноглобулины человека, с его помощью можно сделать более точные заключения об иммунологическом статусе пациента, чем основываясь на других серологических методах (таких как геммаглютинационный ингибиторный тест или тест с реакцией фиксации комплемента).

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест RIDASCREEN® Candida IgG основан на твердофазном «сэндвич»-методе иммуноферментного анализа (ИФА). В лунках полистиролового микропланшета сорбированы очищенные антигены кандиды. Специфические антитела, присутствующие в образце пациента, связываются с антигенами и определяются во время второй стадии инкубации с использованием меченых ферментом антител к индивидуальным иммуноглобулинам человека (конъюгат). В лунки добавляют раствор субстрата. Фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат (H_2O_2 /ТМБ) в конечный продукт синего цвета. Ферментативную реакцию останавливают добавлением серной кислоты (стоп-реагент), при этом цвет смеси меняется с синего на желтый. Конечное измерение оптической плотности производится на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм, с использованием референтной длины волны ≥ 620 нм).

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: 96-луночный, разделяемый на двенадцать 8-луночных стрипов, в рамке-держателе, с адсорбированным антигеном <i>C. albicans</i>	96 опред.
SeroPP	Буфер для разведения образцов: фосфатно-буферный раствор NaCl; желтого цвета; содержит 0,01% тимерозал (мертиолят) и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 110 мл
SeroWP	Промывочный буфер: 10x концентрат; трис-солевой буфер; содержит 0,2% бромидокс-Л и 0,5% Твин 20	1 x 100 мл
Control IgG + зеленая крышка	Стандартный контроль IgG: разведенная сыворотка человека с IgG человека; синего цвета; содержит 0,01% тимерозал и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 2,5 мл
Control IgG - бесцветная крышка	Отрицательный контроль IgG: разведенная сыворотка человека; содержит 0,01% тимерозал и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 1,2 мл
SeroG HD зеленая крышка	Ферментный конъюгат IgG: антитела кролика к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; стабилизирующий белковый раствор; содержит 0,05 % проклина 300; 0,01% метилизотиазолинона; 0,01% бромонитродидоксана; готов к использованию	1 x 12 мл
SeroSC	Субстратный раствор: пероксид водорода / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 12 мл
SeroStop	Стоп-реагент: 0,5 М серная кислота; готов к использованию	1 x 12 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Все реагенты необходимо хранить при температуре 2-8 °С и использовать только до истечения срока годности, указанного на этикетках флаконов. Разведенный промывочный буфер сохраняется в течение срока годности, указанного на этикетке, в условиях хранения при температуре 2-8 °С. Гарантийные обязательства при несоответствии качества набора не обеспечиваются после истечения срока его годности. Пакет из фольги необходимо открывать с помощью ножниц, не повреждая застевку. Все неиспользованные стрипы уберите снова в пакет из фольги, закройте пакет и храните его при температуре 2-8 °С.

Все реагенты необходимо предохранять от микробной контаминации. Бесцветный раствор субстрата необходимо хранить в защищенном от света месте, чтобы избежать порчи или появления окраски в результате самоокисления.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1. Реагенты

- Дистиллированная или деионизованная вода

6.2. Оборудование

- Влажная камера на 37°C
- Пробирки для анализа
- Вортекс
- Микропипетки на объем 10-100 мкл и 100-1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Таймер
- Прибор для промывания микропланшетов или многоканальные пипетки
- Планшетный фотометр (ридер ИФА) (450 нм, при необходимости дополнительная длина волны сравнения ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага (или любая другая впитывающая бумага, например, бумажные полотенца)
- Контейнер для отходов с 0,5% раствором гипохлорита

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Только для диагностики *in vitro*.

Этот тест должен проводить только хорошо обученный лабораторный персонал. Необходимо строго придерживаться правил работы в медицинских лабораториях и точно следовать инструкции для выполнения тестирования.

Никогда не пипетируйте образцы и реагенты с помощью рта, не допускайте их попадания на кожу и слизистые. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми защитными перчатками. После окончания тестирования тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где работали с образцами пациентов и компонентами набора.

Контрольные сыворотки (стандартный контроль и отрицательный контроль) набора прошли проверку на содержание антител к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на HBsAg, и показали отрицательные результаты. Несмотря на это, с ними следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом, соблюдая такие же меры предосторожности (в соответствии с действующими официальными инструкциями и правилами), как при работе с образцами пациентов и всеми другими материалами, с которыми они контактируют.

Стандартный контроль и отрицательный контроль, а также буфер для разведения образцов содержат 0,01% мертиолят (thimerosal) в качестве консерванта. Это вещество не должно попадать на кожу и слизистые.

Промывочный буфер содержит 0,2 % Бронидокс-Л в качестве консерванта. Избегайте контактов с кожей и слизистыми.

H₂O₂ (субстрат) может вызвать ожоги. Обращайтесь с реагентом с осторожностью.

Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте контактов с кожей и одеждой. При попадании на кожу промойте пораженный участок большим количеством воды.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавить при 121°C не менее 1 часа. ВНИМАНИЕ: Чтобы избежать образования ядовитых газов, все остатки жидкости, содержащие стоп-реагент, необходимо нейтрализовать перед удалением их в раствор гипохлорита.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Набор RIDASCREEN® Candida IgG разработан для тестирования образцов сыворотки крови человека. После забора крови во избежание гемолиза сыворотку от сгустка следует отделять как можно быстрее. Образцы до анализа следует хранить охлажденными при температуре 2-8°C или замороженными. Не допускайте повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, липемических, гемолизированных, иктерических или мутных может привести к получению ложных результатов.

Таблица 2. Хранение исследуемых образцов

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общая информация

Перед использованием все реагенты и планшеты [Plate] должны прогреться до комнатной температуры (20-25 °C). Стрипы не следует вынимать из фольгированного пакета до тех пор, пока они не прогреются до комнатной температуры. Перед использованием все реагенты необходимо тщательно перемешать. После использования стрипы (в закрытом пакете) и все реагенты следует хранить при 2-8 °C.

Отбирайте только необходимые объемы реагентов для каждой процедуры. Нельзя возвращать реагенты обратно во флаконы, так как при этом есть опасность контаминации реагентов.

Использованные стрипы нельзя анализировать повторно. Нельзя использовать реагенты и стрипы, если их упаковка была повреждена или если флаконы подтекали.

Некоторые реагенты набора не являются специфичными только для данного теста. Реагенты, имеющие пометку [Sero] (а также [SeroPP]) являются универсальными, т.е. могут использоваться также в других ИФА-наборах RIDASCREEN® вместе с соответствующими специфичными реагентами.

Контрольная сыворотка подобрана для каждой серии. Контрольную сыворотку из данного набора нельзя заменять на контрольные сыворотки из аналогичных наборов других серий.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрата промывочного буфера [SeroWP] смешивают с 9 частями дистиллированной воды. Для этого поместите 100 мл концентрата в мерный цилиндр на 1000 мл и доведите объем раствора

дистиллированной водой до 1000 мл. Любые кристаллы, присутствующие в исходном концентрате, перед разведением необходимо растворить прогреванием на водяной бане при 37 °С. Разведенный буфер можно использовать до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона, если он хранится при температуре 2–8 °С.

9.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите предназначенные для исследования образцы сыворотки буфером для разведения образцов **SeroPP**.

Для определения IgG разведите образцы сыворотки 1:1000:

Например: 10 мкл сыворотки + 90 мкл **SeroPP** (разведение 1:10)
 10 мкл разведения 1:10 + 990 мкл **SeroPP** (конечное разведение 1:1000)

Примечание:

Отрицательный контроль и стандартный контроль поставляются готовыми к использованию и поэтому их НЕЛЬЗЯ разводить или проводить абсорбцию.

9.4. Первая инкубация

Вставьте в рамку необходимое количество лунок. Внесите в соответствующие лунки (кроме лунки A1, предназначенной для измерения реagentного бланка) по 100 мкл разведенных сывороток пациентов и по 100 мкл готовых к использованию контролей. Для отрицательного контроля **Control IgG** следует отвести одну лунку, для стандартного контроля **Control IgG +** – две лунки (дубликаты). Закройте планшет и инкубируйте при 37 °С в течение 30 минут во влажной камере. Во время этого процесса дно лунок не должно касаться теплопроводных материалов (таких как металлы или влажная бумага). Планшет во время инкубации должен быть закрыт.

Лунка A1	Реагентный бланк
Лунка B1	Отрицательный контроль
Лунка C1	Стандартный контроль
Лунка D1	Стандартный контроль
Лунки E1, F1 и т.д.	Сыворотки пациентов №1, №2 и т.д.

Примечание:

Планшет нельзя помещать в только что включенный инкубатор, который будет разогреваться во время инкубации. Температуру инкубатора необходимо отрегулировать перед работой, она должна составлять 37 °С.

9.5. Промывка

Вытряхните или аспирируйте жидкость из лунок в контейнер для отходов, содержащий дезинфицирующую жидкость (например, раствор гипохлорита). Остатки жидкости удалите, энергично постучав перевернутым планшетом по чистой фильтровальной бумаге (или бумажному полотенцу). После этого планшет промойте 4 раза, каждый раз внося в лунки по 300 мкл промывочного буфера. Следите за полным опорожнением лунок; для этого после каждого цикла промывки постучите перевернутым планшетом по сухому участку бумаги.

Если для промывки применяется автоматическое промывочное устройство, правильно отрегулируйте его для используемого типа планшетов. После промывки удалите остатки жидкости из лунок, энергично постучав перевернутым планшетом по чистому бумажному полотенцу (или фильтровальной бумаге).

9.6. Вторая инкубация

Добавьте в соответствующие лунки (включая лунку A1) по 100 мкл конъюгата **SeroA HD**, **SeroG HD** или **SeroM HD**. Затем закройте планшет и инкубируйте при 37 °С в течение 30 минут во влажной камере (см. пункт 9.4).

9.7. Промывка

Промойте планшет 4 раза, как описано в пункте 9.5.

9.8. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 100 мкл субстрата **SeroSc**. Затем закройте планшет и инкубируйте при 37 °С в течение 30 минут во влажной камере.

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку 100 мкл стоп-реагента **SeroStop**. После тщательного перемешивания (мягкое постукивание по краю планшета) измерьте оптическую плотность (ОП) в лунках при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм) на фотометре для планшетов. Калибруйте реагентный бланк (лунка A1) по нулю фотометра.

Примечание: Перед проведением измерения протрите снаружи досуха дно планшета для удаления сконденсировавшейся влаги.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества стандартный контроль (в дубликатах) и отрицательный контроль должны включаться в каждую серию определений. Считается, что тест был проведен правильно, если среднее значение ОП для стандартного контроля, измеренное при 450/620 нм, попадает в диапазон заданных значений (см. прилагаемую к набору листовку-вкладыш). Если результаты двух отдельных измерений отклоняются от среднего значения более чем на 20%, тест необходимо повторить. Величина ОП для отрицательного контроля должна составлять <0,3.

Отклонение указанных величин от установленных, помутнение реагентов или посинение субстрата еще до добавления в лунки – указывают на истечение срока годности реагентов.

Если полученные результаты не укладываются в ожидаемые значения, перед тем как повторить тестирование, проверьте следующие позиции:

- срок годности реагентов
- функциональность используемого оборудования (например, проведите калибрование)
- правильность выполнения процедуры анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел синюю окраску.

Если результаты, полученные для контролей, не соответствуют требованиям даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком продукции R-Biopharm.

11. ОЦЕНКА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Оценку результатов можно проводить тремя различными методами:

1. Используя стандартную кривую, прилагаемую к набору
2. Используя табличные значения (см. прилагаемую к набору листовку-вкладыш)
3. Математическим, используя 4-параметрический метод или α -метод

До оценки результатов из каждого измеренного значения ОП следует вычесть ОП реагентного бланка.

11.1. Оценка с использованием стандартной кривой, прилагаемой к набору

Для оценки результатов с использованием стандартной кривой вначале необходимо средние значения ОП для всех образцов скорректировать по стандартному контролю, чтобы учесть возможные ежедневные флуктуации измеряемых величин. Используя среднюю величину стандартного контроля, полученную в данном анализе, а также заданную величину (target value) стандартного контроля (зависит от партии набора и заносится в прилагаемую листовку-вкладыш), рассчитайте фактор коррекции F по следующей формуле:

$$F = \frac{\text{заданная величина стандартного контроля (target value)}}{\text{средняя величина стандартного контроля данного анализа}}$$

Все измеренные величины ОП для исследуемых образцов умножьте на фактор F и затем (для каждого образца) по стандартной кривой определите концентрацию антител в Ед/мл.

11.2. Оценка с использованием табличных значений

Используя измеренную в данном эксперименте величину ОП стандартного контроля, выберите в таблице столбец с нужным диапазоном значений стандартного контроля. Затем по этому столбцу определите, в какой диапазон значений попадает измеренная в этом же эксперименте ОП для образца пациента. По второму столбцу таблицы определите соответствующий результат образца в Ед/мл, а по первому столбцу – его качественный результат. Пример определения IgG (из листовки-вкладыша к партии набора) (Рис. 1).

	Ед/мл	Диапазон оптических плотностей стандартного контроля
		0,86 – 0,90
-	< 5,0	< 0,19
?	5,0 – 7,0	0,19 – 0,26
	7,1 – 12,0	0,27 – 0,42
	12,1 – 25,0	0,43 – 0,75
+	25,1 – 50,0	0,76 – 1,17
	50,1 – 100,0	1,18 – 1,59
	> 100,0	> 1,59

Например, ОП стандартного контроля нескольких измерений составляет 0,89. В этом случае используется столбец таблицы с диапазоном 0,86 – 0,90. Образец пациента с ОП 0,61 в таком случае попадает в диапазон концентраций антител 12,1 – 25,0 Ед/мл. (Приведенную таблицу следует использовать исключительно в качестве образца, значения в ней могут отличаться от данных в реальном листке-вкладыше из набора).

Качественную оценку полученных результатов (положительный (+), отрицательный (-) или неопределенный (?)) следует проводить по первому столбцу таблицы.

11.3. Математическая оценка

Соответствующие величины, необходимые для математической обработки результатов согласно 4-параметрическому методу или α -методу, приведены в прилагаемой листовке-вкладыше.

11.4. Результаты теста

Таблица 3. Оценка определенных единиц

	IgG
Отрицательные	< 5 Ед/мл
Неоднозначные	5 – 7 Ед/мл
Положительные	> 7 Ед/мл

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система RIDASCREEN® Candida IgG определяет антитела класса IgG к *Candida albicans* и антигенно близким видам. Необходимо отметить, что по измеряемым величинам оптической плотности нельзя судить напрямую о степени выраженности клинических симптомов. Результаты анализа всегда следует интерпретировать в совокупности с полной клинической картиной заболевания.

Отрицательный результат теста необязательно означает, что инфекция отсутствует. Из-за низкой концентрации антител на ранних стадиях легко можно сделать неправильный вывод об их отсутствии. В таком случае, если наличие инфекции все же можно предположить на основании клинических наблюдений, тест следует повторить с парной сывороткой (новым образцом, взятым у того же пациента через 2-4 недели).

Два парных образца сыворотки следует всегда брать для серологического тестирования, чтобы улучшить качество диагностического обследования пациента. Для интерпретации наблюдаемой картины очень важно обнаружение возрастающего титра антител.

Антитела класса IgG к *Candida* обычно находят в значительной части популяции. Поэтому на основании одного только положительного результата теста по IgG-антителам нельзя делать вывод об остром характере заболевания. Для интерпретации наблюдаемой картины очень важно обнаружение возрастающего титра антител.

Положительный результат в качестве причины заболевания не исключает наличие другого инфекционного патогена.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4. Вариации результатов, полученных в разных постановках анализа (n = 5).

Вариации в разных постановках анализа	IgG	
	ОП	CV
Сыворотка 1	0,101	8,9%
Сыворотка 2	0,659	7,3%
Сыворотка 3	1,246	5,4%

Таблица 5. Вариации результатов, полученных в одной постановке (n = 24).

Вариации в одной постановке анализа	IgG	
	ОП	CV
Сыворотка 1	0,087	6,1%
Сыворотка 2	0,614	3,0%
Сыворотка 3	1,201	2,8%

Таблица 6. Чувствительность и специфичность, полученные при сравнении с двумя другими коммерческими ИФА-наборами.

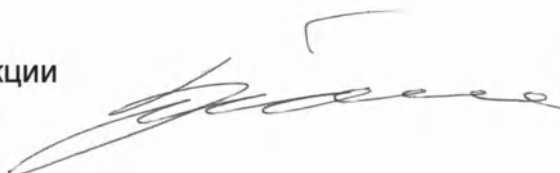
	IgG
Чувствительность	87,5%
Специфичность	100,0%

Таблица 7. Результаты тестирования образцов сыворотки 212 доноров крови (из центра донорства крови в Германии).

Образцы сыворотки 212 доноров крови	IgG
Отрицательные	42,9%
Неоднозначные	2,4%
Положительные	54,7%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения IgM антител к кандида альбиканс
(RIDASCREEN® Candida IgM)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Candida IgM

Иммуноферментный тест для полуколичественного определения антител класса IgM к *Candida albicans* и антигенно-близких видов в сыворотке крови человека

Набор на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Для диагностического использования *in vitro*. Набор реагентов RIDASCREEN® Candida IgM является иммуноферментной тест-системой для полуколичественного определения антител класса IgM к *Candida albicans* и антигенно близких видов в сыворотке крови человека. Их следует использовать как подтверждающие тесты при подозрении на кандидозную инфекцию или при уточнении иммунного статуса.

2. ВВЕДЕНИЕ

После начала инфекции в результате ответа иммунной системы в организме формируются специфические антитела к патогену. С помощью иммунологических методов можно проводить определение антител в сыворотке крови. При этом значимость теста определяется как используемым методом тестирования, так и выбором антигена, специфичного для патогена. Так, данный ИФА может дифференцировать индивидуальные иммуноглобулины человека, с его помощью можно сделать более точные заключения об иммунологическом статусе пациента, чем основываясь на других серологических методах (таких как геммаглютинационный ингибиторный тест или тест с реакцией фиксации комплемента).

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест RIDASCREEN® Candida IgM основан на твердофазном «сэндвич»-методе иммуноферментного анализа (ИФА). В лунках полистиролового микропланшета сорбированы очищенные антигены кандиды. Специфические антитела, присутствующие в образце пациента, связываются с антигенами и определяются во время второй стадии инкубации с использованием меченых ферментом антител к индивидуальным иммуноглобулинам человека (конъюгат). В лунки добавляют раствор субстрата. Фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат (H_2O_2 /ТМБ) в конечный продукт синего цвета. Ферментативную реакцию останавливают добавлением серной кислоты (стоп-реагент), при этом цвет смеси меняется с синего на желтый. Конечное измерение оптической плотности производится на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм, с использованием референтной длины волны ≥ 620 нм).

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: 96-луночный, разделяемый на двенадцать 8-луночных стрипов, в рамке-держателе, с адсорбированным антигеном <i>C. albicans</i>	96 опред.
SeroPP	Буфер для разведения образцов: фосфатно-буферный раствор NaCl; желтого цвета; содержит 0,01% тимерозал (мертиолят) и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 110 мл
SeroWP	Промывочный буфер: 10x концентрат; трис-солевой буфер; содержит 0,2% бромидокс-Л и 0,5% Твин 20	1 x 100 мл
Control IgM + красная крышка	Стандартный контроль IgM: разведенная сыворотка человека с IgM человека; синего цвета; содержит 0,01% тимерозал и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 2,5 мл
Control IgM - бесцветная крышка	Отрицательный контроль IgM: разведенная сыворотка человека; содержит 0,01% тимерозал и 0,05% Твин 20; готов к использованию	1 x 1,2 мл
SeroM HD красная крышка	Ферментный конъюгат IgM: антитела кролика к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; стабилизирующий белковый раствор; содержит 0,05 % проклина 300; 0,01% метилизотиазолинона; 0,01% бромонитродιοксана; готов к использованию	1 x 12 мл
SeroSC	Субстратный раствор: пероксид водорода / тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 12 мл
SeroStop	Стоп-реагент: 0,5 М серная кислота; готов к использованию	1 x 12 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Все реагенты необходимо хранить при температуре 2-8 °С и использовать только до истечения срока годности, указанного на этикетках флаконов. Разведенный промывочный буфер сохраняется в течение срока годности, указанного на этикетке, в условиях хранения при температуре 2-8 °С. Гарантийные обязательства при несоответствии качества набора не обеспечиваются после истечения срока его годности. Пакет из фольги необходимо открывать с помощью ножниц, не повреждая застежку. Все неиспользованные стрипы уберите снова в пакет из фольги, закройте пакет и храните его при температуре 2-8 °С.

Все реагенты необходимо предохранять от микробной контаминации. Бесцветный раствор субстрата необходимо хранить в защищенном от света месте, чтобы избежать порчи или появления окраски в результате самоокисления.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1. Реагенты

- Дистиллированная или деионизованная вода

6.2. Оборудование

- Влажная камера на 37°C
- Пробирки для анализа
- Вортекс
- Микропипетки на объем 10-100 мкл и 100-1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Таймер
- Прибор для промывания микропланшетов или многоканальные пипетки
- Планшетный фотометр (ридер ИФА) (450 нм, при необходимости дополнительная длина волны сравнения ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага (или любая другая впитывающая бумага, например, бумажные полотенца)
- Контейнер для отходов с 0,5% раствором гипохлорита

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Только для диагностики *in vitro*.

Этот тест должен проводить только хорошо обученный лабораторный персонал. Необходимо строго придерживаться правил работы в медицинских лабораториях и точно следовать инструкции для выполнения тестирования.

Никогда не пипетируйте образцы и реагенты с помощью рта, не допускайте их попадания на кожу и слизистые. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми защитными перчатками. После окончания тестирования тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где работали с образцами пациентов и компонентами набора.

Контрольные сыворотки (стандартный контроль и отрицательный контроль) набора прошли проверку на содержание антител к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на HBsAg, и показали отрицательные результаты. Несмотря на это, с ними следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом, соблюдая такие же меры предосторожности (в соответствии с действующими официальными инструкциями и правилами), как при работе с образцами пациентов и всеми другими материалами, с которыми они контактируют.

Стандартный контроль и отрицательный контроль, а также буфер для разведения образцов содержат 0,01% мертиолят (thimerosal) в качестве консерванта. Это вещество не должно попадать на кожу и слизистые.

Промывочный буфер содержит 0,2 % бромидокс-Л в качестве консерванта. Избегайте контактов с кожей и слизистыми.

H₂O₂ (субстрат) может вызвать ожоги. Обращайтесь с реагентом с осторожностью.

Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте контактов с кожей и одеждой. При попадании на кожу промойте пораженный участок большим количеством воды.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавить при 121°C не менее 1 часа.

ВНИМАНИЕ: Чтобы избежать образования ядовитых газов, все остатки жидкости, содержащие стоп-реагент, необходимо нейтрализовать перед удалением их в раствор гипохлорита.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Набор RIDASCREEN® Candida IgM разработан для тестирования образцов сыворотки крови человека. После забора крови во избежание гемолиза сыворотку от сгустка следует отделять как можно быстрее. Образцы до анализа следует хранить охлажденными при температуре 2-8°C или замороженными. Не допускайте повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, липемических, гемолизированных, иктерических или мутных может привести к получению ложных результатов.

Таблица 2. Хранение исследуемых образцов

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общая информация

Перед использованием все реагенты и планшеты [Plate] должны прогреться до комнатной температуры (20-25 °C). Стрипы не следует вынимать из фольгированного пакета до тех пор, пока они не прогреются до комнатной температуры. Перед использованием все реагенты необходимо тщательно перемешать. После использования стрипы (в закрытом пакете) и все реагенты следует хранить при 2-8 °C.

Отбирайте только необходимые объемы реагентов для каждой процедуры. Нельзя возвращать реагенты обратно во флаконы, так как при этом есть опасность контаминации реагентов.

Использованные стрипы нельзя анализировать повторно. Нельзя использовать реагенты и стрипы, если их упаковка была повреждена или если флаконы подтекали.

Некоторые реагенты набора не являются специфичными только для данного теста. Реагенты, имеющие пометку [Sero] (а также [SeroPP]) являются универсальными, т.е. могут использоваться также в других ИФА-наборах RIDASCREEN® вместе с соответствующими специфичными реагентами.

Контрольная сыворотка подобрана для каждой серии. Контрольную сыворотку из данного набора нельзя заменять на контрольные сыворотки из аналогичных наборов других серий.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрата промывочного буфера [SeroWP] смешивают с 9 частями дистиллированной воды. Для этого поместите 100 мл концентрата в мерный цилиндр на 1000 мл и доведите объем раствора

дистиллированной водой до 1000 мл. Любые кристаллы, присутствующие в исходном концентрате, перед разведением необходимо растворить прогреванием на водяной бане при 37 °С. Разведенный буфер можно использовать до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона, если он хранится при температуре 2–8 °С.

9.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите предназначенные для исследования образцы сыворотки буфером для разведения образцов **SeroPP**.

Разведите образцы сыворотки 1:200:

Например: 10 мкл сыворотки + 90 мкл **SeroPP** (разведение 1:10)
 10 мкл разведения 1:10 + 190 мкл **SeroPP** (конечное разведение 1:200)

Для определений IgM рекомендуется из образцов сыворотки предварительно удалить IgG (например, обработать препаратом RIDA® RF-Absorbens, кат. № Z0202), и затем образцы разбавить буфером для разведения образцов до требуемого разведения, как описано выше.

Примечание:

Отрицательный контроль и стандартный контроль поставляются готовыми к использованию и поэтому их НЕЛЬЗЯ разводить или проводить абсорбцию.

9.4. Первая инкубация

Вставьте в рамку необходимое количество лунок. Внесите в соответствующие лунки (кроме лунки A1, предназначенной для измерения реagenтного бланка) по 100 мкл разведенных сывороток пациентов и по 100 мкл готовых к использованию контролей. Для отрицательного контроля **Control IgM** следует отвести одну лунку, для стандартного контроля **Control IgM** – две лунки (дубликаты). Закройте планшет и инкубируйте при 37 °С в течение 30 минут во влажной камере. Во время этого процесса дно лунок не должно касаться теплопроводных материалов (таких как металлы или влажная бумага). Планшет во время инкубации должен быть закрыт.

Лунка A1	Реагентный бланк
Лунка B1	Отрицательный контроль
Лунка C1	Стандартный контроль
Лунка D1	Стандартный контроль
Лунки E1, F1 и т.д.	Сыворотки пациентов №1, №2 и т.д.

Примечание:

Планшет нельзя помещать в только что включенный инкубатор, который будет разогреваться во время инкубации. Температуру инкубатора необходимо отрегулировать перед работой, она должна составлять 37 °С.

9.5. Промывка

Вытряхните или аспирируйте жидкость из лунок в контейнер для отходов, содержащий дезинфицирующую жидкость (например, раствор гипохлорита). Остатки жидкости удалите, энергично постучав перевернутым планшетом по чистой фильтровальной бумаге (или бумажному полотенцу). После этого планшет промойте 4 раза, каждый раз внося в лунки по 300 мкл промывочного буфера. Следите за полным опорожнением лунок; для этого после каждого цикла промывки постучите перевернутым планшетом по сухому участку бумаги.

Если для промывки применяется автоматическое промывочное устройство, правильно отрегулируйте его для используемого типа планшетов. После промывки удалите остатки жидкости из лунок, энергично постучав перевернутым планшетом по чистому бумажному полотенцу (или фильтровальной бумаге).

9.6. Вторая инкубация

Добавьте в соответствующие лунки (включая лунку A1) по 100 мкл конъюгата **SeroA HD**, **SeroG HD** или **SeroM HD**. Затем закройте планшет и инкубируйте при 37 °С в течение 30 минут во влажной камере (см. пункт 9.4).

9.7. Промывка

Промойте планшет 4 раза, как описано в пункте 9.5.

9.8. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 100 мкл субстрата **SeroSc**. Затем закройте планшет и инкубируйте при 37 °С в течение 30 минут во влажной камере.

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку 100 мкл стоп-реагента **SeroStop**. После тщательного перемешивания (мягкое постукивание по краю планшета) измерьте оптическую

плотность (ОП) в лунках при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм) на фотометре для планшетов. Калибруйте реагентный бланк (лунка A1) по нулю фотометра.

Примечание: Перед проведением измерения протрите снаружи досуха дно планшета для удаления сконденсировавшейся влаги.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – УКАЗАНИЯ НА НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ИЛИ ПОРЧУ РЕАГЕНТОВ

Для проверки контроля качества стандартный контроль (в дубликатах) и отрицательный контроль должны включаться в каждую серию определений. Считается, что тест был проведен правильно, если среднее значение ОП для стандартного контроля, измеренное при 450/620 нм, попадает в диапазон заданных значений (см. прилагаемую к набору листовку-вкладыш). Если результаты двух отдельных измерений отклоняются от среднего значения более чем на 20%, тест необходимо повторить. Величина ОП для отрицательного контроля должна составлять $<0,3$.

Отклонение указанных величин от установленных, помутнение реагентов или посинение субстрата еще до добавления в лунки – указывают на истечение срока годности реагентов.

Если полученные результаты не укладываются в ожидаемые значения, перед тем как повторить тестирование, проверьте следующие позиции:

- срок годности реагентов
- функциональность используемого оборудования (например, проведите калибрование)
- правильность выполнения процедуры анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел синюю окраску.

Если результаты, полученные для контролей, не соответствуют требованиям даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком продукции R-Biopharm.

11. ОЦЕНКА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Оценку результатов можно проводить тремя различными методами:

1. Используя стандартную кривую, прилагаемую к набору
2. Используя табличные значения (см. прилагаемую к набору листовку-вкладыш)
3. Математическим, используя 4-параметрический метод или ∞ -метод

До оценки результатов из каждого измеренного значения ОП следует вычесть ОП реагентного бланка.

11.1. Оценка с использованием стандартной кривой, прилагаемой к набору

Для оценки результатов с использованием стандартной кривой вначале необходимо средние значения ОП для всех образцов скорректировать по стандартному контролю, чтобы учесть возможные ежедневные флуктуации измеряемых величин. Используя среднюю величину стандартного контроля, полученную в данном анализе, а также заданную величину (target value) стандартного контроля (зависит от партии набора и заносится в прилагаемую листовку-вкладыш), рассчитайте фактор коррекции F по следующей формуле:

$$F = \frac{\text{заданная величина стандартного контроля (target value)}}{\text{средняя величина стандартного контроля данного анализа}}$$

Все измеренные величины ОП для исследуемых образцов умножьте на фактор F и затем (для каждого образца) по стандартной кривой определите концентрацию антител в Ед/мл.

11.2. Оценка с использованием табличных значений

Используя измеренную в данном эксперименте величину ОП стандартного контроля, выберите в таблице столбец с нужным диапазоном значений стандартного контроля. Затем по этому столбцу определите, в какой диапазон значений попадает измеренная в этом же эксперименте ОП для образца пациента. По второму столбцу таблицы определите соответствующий результат образца в Ед/мл, а по первому столбцу – его качественный результат.

	Ед/мл	Диапазон оптических плотностей стандартного контроля
		0,86 – 0,90
-	< 5,0	< 0,19
?	5,0 – 7,0	0,19 – 0,26
	7,1 – 12,0	0,27 – 0,42
	12,1 – 25,0	0,43 – 0,75
+	25,1 – 50,0	0,76 – 1,17
	50,1 – 100,0	1,18 – 1,59
	> 100,0	> 1,59

Рис. 1. Пример определения IgG (из листовки-вкладыша к партии наборов)

Например, ОП стандартного контроля нескольких измерений составляет 0,89. В этом случае используется столбец таблицы с диапазоном 0,86 – 0,90. Образец пациента с ОП 0,61 в таком случае попадает в диапазон концентраций антител 12,1 – 25,0 Ед/мл. (Приведенную таблицу следует использовать исключительно в качестве образца, значения в ней могут отличаться от данных в реальном листке-вкладыше из набора).

Качественную оценку полученных результатов (положительный (+), отрицательный (-) или неопределенный (?)) следует проводить по первому столбцу таблицы.

11.3. Математическая оценка

Соответствующие величины, необходимые для математической обработки результатов согласно 4-параметрическому методу или α -методу, приведены в прилагаемой листовке-вкладыше.

11.4. Результаты теста

Таблица 3. Оценка определенных единиц

	IgM
Отрицательные	< 20 Ед/мл
Неоднозначные	20 – 25 Ед/мл
Положительные	> 25 Ед/мл

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система RIDASCREEN® Candida IgM определяет антитела класса IgM к *Candida albicans* и антигенно близким видам. Необходимо отметить, что по измеряемым величинам оптической плотности нельзя судить напрямую о степени выраженности клинических симптомов. Результаты анализа всегда следует интерпретировать в совокупности с полной клинической картиной заболевания.

Отрицательный результат теста необязательно означает, что инфекция отсутствует. Из-за низкой концентрации антител на ранних стадиях легко можно сделать неправильный вывод об их отсутствии. В таком случае, если наличие инфекции все же можно предположить на основании клинических наблюдений, тест следует повторить с парной сывороткой (новым образцом, взятым у того же пациента через 2-4 недели).

Два парных образца сыворотки следует всегда брать для серологического тестирования, чтобы улучшить качество диагностического обследования пациента. Для интерпретации наблюдаемой картины очень важно обнаружение возрастающего титра антител.

Положительный ответ по IgM-антителам указывает на острое развитие заболевания. В этот период вероятно проникновение *Candida* или антигенов *Candida* в сосудистую систему. Однако, вывод о системном проявлении инфекции можно сделать только при наличии выраженной клинической картины и истории заражения.

Положительный результат в качестве причины заболевания не исключает наличие другого инфекционного патогена.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Таблица 4.** Вариации результатов, полученных в разных постановках анализа (n = 5).

Вариации в разных постановках анализа	IgM	
	ОП	CV
Сыворотка 1	0,389	3,9%
Сыворотка 2	0,983	3,5%
Сыворотка 3	1,372	2,4%

Таблица 5. Вариации результатов, полученных в одной постановке (n = 24).

Вариации в одной постановке анализа	IgM	
	ОП	CV
Сыворотка 1	0,348	3,9%
Сыворотка 2	0,877	2,7%
Сыворотка 3	1,287	2,7%

Таблица 6. Чувствительность и специфичность, полученные при сравнении с двумя другими коммерческими ИФА-наборами.

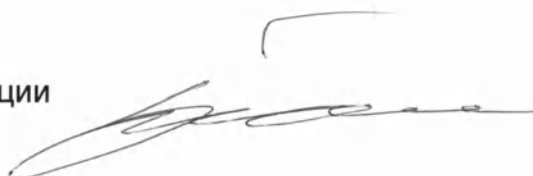
	IgM
Чувствительность	87,8%
Специфичность	100,0%

Таблица 7. Результаты тестирования образцов сыворотки 212 доноров крови (из центра донорства крови в Германии).

Образцы сыворотки 212 доноров крови	IgM
Отрицательные	90,6%
Неоднозначные	2,8%
Положительные	6,6%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

М.И. Прищеп

«10» ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения IgG антител к эхинококкам
(RIDASCREEN® Echinococcus IgG)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Echinococcus IgG

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgG к эхинококкам в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест RIDASCREEN® Echinococcus IgG – диагностическая иммуноферментная (ИФА) тест-система для выявления *in vitro* специфических антител класса IgG к однокамерному (*Echinococcus granulosus*) и многокамерному (*Echinococcus multilocularis*) эхинококкам в сыворотке крови человека. Тест показан при подозрении на инвазию *Echinococcus* или для определения иммунного статуса организма.

2. ВВЕДЕНИЕ

В результате инвазии *Echinococcus* происходит формирование специфических антител к патогену, определение которых в сыворотке крови возможно с помощью иммунологических методов. Выбор метода и определяемых патоген-специфичных антител имеет важное значение для диагностики. По сравнению с другими серологическими методами (например, РСК) метод ИФА является более чувствительным и специфичным.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител класса IgG к *Echinococcus* основано на двухстадийном непрямом иммуноферментном анализе. Инактивированные растворенные антигены *Echinococcus* сорбированы на поверхности лунок микропланшета. В лунки вносят разведенные образцы сыворотки крови и контроли и инкубируют при комнатной температуре. Имеющиеся в них антитела, специфичные к *Echinococcus*, связываются с иммобилизованными антигенами. Несвязавшиеся антитела удаляются промывкой.

На второй стадии в лунки вносят конъюгированные с пероксидазой антитела к IgG человека. После инкубации несвязавшийся конъюгат удаляется промывкой. В лунки добавляют субстрат (перекись водорода с мочевиной) и хромоген (ТМБ) и инкубируют при комнатной температуре. Фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат/хромоген в голубую жидкость. Добавление стоп-реагента меняет ее цвет на желтый. Оптическую плотность измеряют при длине волны 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет 96-луночный: в рамке-держателе, состоящий из двенадцати 8-луночных стрипов с отделяемыми лунками, покрытых растворимым антигеном <i>Echinococcus granulosus</i> из кист; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 лунок
Diluent крышка не окрашена	Буфер для разведения образцов: фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,1% Kathon CG и 0,1% Твин 20; желтого цвета; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash коричневая крышка	Промывочный буфер: 20x концентрат; фосфатно-буферный раствор; содержит 0,5% Kathon CG и 1,5% Твин 20	1 x 50 мл
Control + красная крышка	Положительный контроль IgG: инактивированная сыворотка с IgG человека; содержит 0,1% Kathon; готов к использованию	1 x 1,2 мл
Control - крышка не окрашена	Отрицательный контроль IgG: сыворотка, не содержащая IgG; содержит 0,1% Kathon и 0,1% Твин 20; готов к использованию	1 x 2,5 мл
Conjugate оранжевая крышка	Конъюгат антител мыши к IgG человека: антитела в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,01% метилизотиазолинон, 0,01% бромонитродидоксан, 0,05% проклин 300; готов к использованию	1 x 12 мл
Substrate зеленая крышка	Субстратный раствор: пероксид мочевины; готов к использованию	1 x 6 мл
Chromogen голубая крышка	Хромоген: тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 6 мл
Stop желтая крышка	Стоп-реагент: 0,5 М раствор серной кислоты; готов к использованию	1 x 6 мл
Инструкция по применению		

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Пробирки для разведения образцов
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 10 – 100 мкл и 100 - 1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Следует избегать микробной контаминации. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Разведенный промывочный буфер можно хранить в течение 4 недель при температуре 2-8 °С.

Перед использованием все реагенты и стрипы должны быть доведены до комнатной температуры. Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов, не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной. Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застежку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °С.

Хромоген бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если хромоген приобрел голубую окраску, он становится непригодным.

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для диагностики *in vitro*.

- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.

- Контрольные сыворотки (положительный и отрицательный контроль) были проверены на антитела к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на наличие антигена гепатита В, и при этом показали отрицательные результаты. Однако, как контроли, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Не следует пипетировать ртом образцы или реагенты, необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Положительный контроль и раствор для разведения образцов содержат 0,1% катон в качестве консерванта. Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
- Пероксид мочевины может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °С, по меньшей мере, в течение одного часа.
- **ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоты, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

7. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Echinococcus IgG предназначена для исследования образцов сыворотки крови человека. После взятия крови необходимо как можно скорее отделить сгусток во избежание гемолиза. Образцы следует хранить в холодильнике или в замороженном виде до момента исследования. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, подвергшихся тепловой обработке, липемических, гемолизированных, желтушных и мутных - может привести к получению неверных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразбавленная сыворотка		Разбавленная сыворотка
2-8 °С	- 20 °С	2-8 °С
1 неделя	больше одной недели	7 часов

8. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

8.1. Общие замечания

Перед использованием доведите все реагенты и стрипы до комнатной температуры в течение не менее 30 минут. Не извлекайте стрипы из упаковки до того, как они прогреются до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Сразу после использования набор необходимо поместить на хранение при температуре 2-8 °С.

Отбирайте только необходимое для анализа количество реагентов. Не выливайте оставшиеся реагенты обратно во флаконы, чтобы не допустить контаминации.

Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы.

Промывочный буфер, буфер для разведения образцов и субстрат/хромоген неспецифичны и могут использоваться для постановки тестов RIDASCREEN® на определение антител к другим паразитам.

8.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера [Wash] развести в 19 частях дистиллированной воды. Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °С.

Внесите 50 мл концентрированного промывочного буфера в мерный цилиндр объемом 1000 мл. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой. Готовый промывочный буфер можно хранить в течение 4 недель при температуре 2-8 °С.

8.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите образцы сыворотки крови буфером для разведения образцов [Diluent] 1 : 50, например, следующим образом:

10 мкл образца сыворотки крови + 490 мкл буфера для разведения образцов [Diluent]

Внимание! Контроли, входящие в состав набора, готовы к использованию и не требуют разведения.

8.4. Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 100 мкл положительного контроля, отрицательного контроля или разведенных образцов сыворотки крови.

Инкубируйте при комнатной температуре (20-25°C) в течение **15 минут**. В каждом анализе рекомендуется отводить по 2 лунки для отрицательного контроля.

8.5. Промывка

Вылейте или отсосите содержимое лунок в пустой контейнер с дезинфицирующим раствором. Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Затем промойте все лунки 5 раз, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следите за тем, чтобы промывочное устройство подходило для планшетов этого типа.

8.6. Вторая инкубация

В каждую лунку внесите по 100 мкл (или по 2 капли) конъюгата антител **Conjugate** к IgG человека. Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25 °C) в течение **15 минут**.

8.7. Промывка

Промойте планшет 5 раз как описано в пункте 9.5.

8.8. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 50 мкл (или по 1 капле) субстрата **Substrate** и по 50 мкл (или 1 капле) хромогена **Chromogen**. Инкубируйте планшет в течение **15 минут** при комнатной температуре (20-25 °C). По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл (или 1 капле) стоп-реагента **Stop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках с помощью планшетного спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

9. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для контроля качества положительный и отрицательный (в дубле) контроли должны включаться в каждую серию определений. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность (ОП) положительного контроля при 450 нм выше 0,8. Средняя оптическая плотность отрицательного контроля при 450 нм должна быть ниже 0,3. Если оптическая плотность отдельных значений отрицательного контроля отличается от средней оптической плотности более чем на 25%, тест следует повторить.

Если полученные значения отличаются от указанных, если хромоген помутнел или приобрел голубую окраску до внесения в лунки стрипов, можно предположить, что срок годности реагентов истек.

Пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дистрибьютеру.

10. Расчет индекса пробы

1. Рассчитайте среднюю ОП отрицательного контроля.
2. Прибавьте 0,150 к средней ОП. Полученный результат является cut-off (уровнем отсечения) анализа.
3. Вычислите индекс пробы, разделив ОП образца на значение cut-off.

Например:

отрицательный контроль лунка 1	ОП = 0,115
отрицательный контроль лунка 2	ОП = 0,125
образец	ОП = 0,508

$$\text{значение cut-off} = \frac{0,115 + 0,125}{2} + 0,150 = 0,270$$

$$\text{индекс пробы} = \frac{0,508}{0,270} = 1,88$$

11. Интерпретация результатов**Таблица 3.** Оценка индекса пробы.

	отрицательный	неопределенный	положительный
Индекс пробы	< 0,9	0,9 – 1,1	> 1,1

12. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Echinococcus IgG выявляет антитела как к однокамерному (*Echinococcus granulosus*) так и многокамерному (*Echinococcus multilocularis*) эхинококкам. Ее следует использовать в случаях подозрения на эхинококкоз.

Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клиническим диагнозом и результатами других диагностических исследований.

Выработка антител в ответ на паразитарную инвазию широко варьирует в зависимости от локализации эхинококка и очень индивидуальна.

Отрицательный результат, в целом, не исключает эхинококкоз. Из-за низкого титра антител на начальной стадии заболевания, результат теста, проведенного в этот период, может быть отрицательным или неопределенным. Если имеется подозрение на наличие данной инвазии, исходя из клинических данных, следует провести анализ другого образца сыворотки крови этого пациента через 2 – 4 недели.

Существует возможность перекрестной реакции с антителами к свиному цепню (*Taenia solium*).

Положительный результат на наличие антител к эхинококкам не исключает присутствия в образце других патогенов.

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Вариация между постановками (n=5)	IgG	
	ОП	Коэффициент вариации, %
Сыворотка 1	0,223	5,7
Сыворотка 2	0,592	5,5
Сыворотка 3	0,840	5,0

Вариация внутри постановки (n=24)	IgG	
	ОП	Коэффициент вариации, %
Сыворотка 1	0,099	8,6
Сыворотка 2	0,357	6,9
Сыворотка 3	0,628	6,3

Чувствительность и специфичность оценивали по сравнению с двумя другими коммерчески доступными наборами ИФА.

Чувствительность: 100,0%

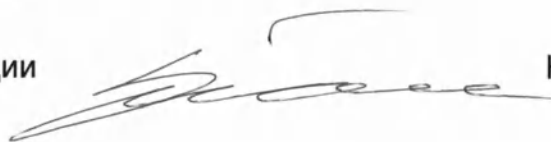
Специфичность: 100,0%

Результаты исследования 200 образцов сыворотки доноров крови, взятых из центра доноров крови Германии:

	отрицательный	неопределенный	положительный
200 образцов сыворотки	100%	0%	0%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 3 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»

М.И. Прищепа
«10» ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения IgG антител к лейшманиям
(RIDASCREEN® Leishmania Ab)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Leishmania Ab

Иммуноферментный тест для качественного определения IgG антител к *Leishmania* спес. в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест RIDASCREEN® Leishmania Ab – диагностическая иммуноферментная (ИФА) тест-система для определения *in vitro* специфических антител к *Leishmania* (виды: *donovani*, *major*, *mexicana*, *braziliensis*) в сыворотке крови человека.

2. ВВЕДЕНИЕ

Лейшманиоз – это паразитарное заболевание, вызываемое различными видами жгутиковых простейших рода *Leishmania*. Наиболее характерными клиническими формами этого заболевания являются:

- а) Висцеральный лейшманиоз или кала-азар. Вызывается *L. donovani* (Индия, Африка), *L. infantum* (Средиземноморская зона, Азия, Ближний Восток) и *L. chagasi* (Южная Америка). Фагоцитированные паразиты встречаются в огромных количествах в клетках ретикулоэндотелиальной системы (РС) селезенки, печени, лимфатических узлов, костного мозга, слизистой оболочки кишечника и других органов. Эти органы имеют тенденцию к увеличению из-за аномального роста клеток РС. Инкубационный период составляет от 1 до 4 месяцев. Первоначальная лихорадка перемежающаяся, температура достигает 40 °С. Развивается сильная лейкопения с относительным моноцитозом и лимфоцитозом, анемия и тромбоцитопения, выявляя пациентов особенно подверженных вторичной инфекции. При отсутствии лечения болезнь прогрессирует и заканчивается летальным исходом в течение 2 лет, хотя при молниеносной форме заболевания смерть может наступить в течение нескольких недель.
- б) Кожный лейшманиоз. Вызывается *L. major* или *tropica* (Старый Свет) и *L. mexicana* и *L. braziliensis* (Америка). Болезнь известна под разными названиями в разных странах. У людей заболевание ограничивается поражением кожи. Инкубационный период составляет от 2 недель до нескольких месяцев. Это наиболее легкая форма заболевания.
- в) Американский или кожно-слизистый лейшманиоз. Обычно вызывается *L. braziliensis*, хотя и другие виды могут быть причиной поражения кожного покрова и слизистых оболочек. По клиническому проявлению и гистопатологии американский лейшманиоз идентичен кожному лейшманиозу, за исключением более обширного вовлечения мембран слизистых оболочек. Поражения слизистых оболочек болезненны и могут привести к значительным деформациям при эрозии носовых перегородок, неба или гортани.

Жизненный цикл лейшманий включает пребывание в одном из двух хозяев – позвоночном животном или насекомом. Естественными хозяевами, помимо человека, могут быть грызуны и плотоядные животные. Беспозвоночными хозяевами являются москиты родов *Phlebotomus* и *Lutzomya* (Америка). При кровососании на больных людях паразиты, находящиеся в инфицированных клетках, попадают в кишечник москитов, где превращаются из амастиготной формы (безжгутиковой) в промастиготную (жгутиковую) и размножаются. В течение 8 – 20 дней в передней части кишечника и глотки москита скапливается большое количество промастигот. Заражение человека происходит при укусе москитом, когда часть промастигот попадает в кожу жертвы. Трансмиссия также может происходить при инфицировании ран.

Лейшманиоз широко распространен по всему миру, главным образом в тропической и субтропической зонах. Случаи заболевания растут, и предполагается, что опасность заражения угрожает 350 миллионам людей. Это одно из шести наиболее значимых инфекционных заболеваний в мире.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител к *Leishmania* основано на двухстадийном непрямом иммуноферментном анализе. Инактивированные растворимые антигены *Leishmania* сорбированы на поверхности лунок микропланшета. В лунки вносят разведенные образцы сыворотки крови, контроли и инкубируют при комнатной температуре. Имеющиеся в них антитела к *Leishmania* связываются с иммобилизованными антигенами. Несвязавшиеся антитела удаляются промывкой.

На второй стадии в лунки вносят конъюгированные с пероксидазой антитела к IgG человека. Они взаимодействуют с антителами, связавшимися на первой стадии. После инкубации несвязавшийся конъюгат удаляется промывкой. В лунки добавляют субстрат (перекись водорода с мочевиной) и хромоген (ТМБ) и инкубируют при комнатной температуре. Фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат/хромоген в голубую жидкость. Добавление стоп-реагента меняет ее цвет на желтый. Оптическую плотность измеряют при длине волны 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм). Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: 96-луночный, в рамке-держателе, разделяемый на двенадцать 8-луночных стрипов, покрытых антигенами <i>Leishmania</i> ; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 лунок
Diluent бесцветная крышка	Буфер для разведения образцов: фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,1% Kathon CG и 0,1% Твин 20; желтого цвета; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash коричневая крышка	Промывочный буфер: 20x концентрат; фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,5% Kathon CG и 1,5% Твин 20	1 x 50 мл
Control + красная крышка	Положительный контроль: инактивированная сыворотка, содержащая IgG человека; содержит 0,1% Kathon CG; готов к использованию	1 x 1,2 мл
Control - крышка не окрашена	Отрицательный контроль: инактивированная сыворотка, не содержащая IgG человека; содержит 0,1% Kathon и 0,1% Твин 20; готов к использованию	1 x 2,5 мл
Conjugate оранжевая крышка	Конъюгат антител козы к IgG человека: антитела в стабилизирующем растворе, конъюгированные с пероксидазой хрена; содержит 0,01% метилизотиазолинон, 0,01% бромонитродиоксан, проклин; готов к использованию	1 x 12 мл
Substrate зеленая крышка	Субстратный раствор: пероксид мочевины; готов к использованию	1 x 6 мл
Chromogen голубая крышка	Хромоген: тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию.	1 x 6 мл
Stop желтая крышка	Стоп-реагент: 0,5 М раствор серной кислоты; готов к использованию	1 x 6 мл

Инструкция по применению

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Пробирки для разведения образцов
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 10 – 100 мкл и 100 - 1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для *in vitro* диагностики.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Контрольные сыворотки были проверены на антитела к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на наличие антигена гепатита В, и при этом показали отрицательные результаты. Однако, как контроли, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Пероксид мочевины может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно!
- Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой!
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121°С, по меньшей мере, в течение одного часа.
- Не допускается использование реагентов из наборов других серий.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Следует избегать микробной контаминации. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Перед использованием все реагенты и стрипы должны быть прогреты до комнатной температуры. Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов, не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной. Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застевку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °С.

Хромоген бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за аутоокисления. Если хромоген приобрел голубую окраску, он становится непригодным.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для диагностики *in vitro*.

- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Контрольные сыворотки (положительный и отрицательный контроль) были проверены на антитела к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на наличие антигена гепатита В, и при этом показали отрицательные результаты. Однако, как контроли, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Не следует пипетировать ртом образцы или реагенты, необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Положительный контроль и раствор для разведения образцов содержат 0,1% катон в качестве консерванта. Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
- Пероксид мочевины может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121°С, по меньшей мере, в течение одного часа.
- **ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

8. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Leishmania Ab предназначена для исследования образцов сыворотки крови человека.

Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, подвергшихся тепловой обработке, липемических, гемолизированных, желтушных и мутных образцов может привести к получению неверных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразбавленная сыворотка		Разбавленная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	больше одной недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием прогрейте все реагенты и стрипы до комнатной температуры в течение не менее 30 минут. Не извлекайте стрипы из упаковки до того, как они прогреются до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Сразу после использования набор необходимо поместить на хранение при температуре 2-8 °C.

Отбирайте только необходимое для анализа количество реагентов. Не выливайте оставшиеся реагенты обратно во флаконы чтобы не допустить контаминации

Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы.

Промывочный буфер, буфер для разведения образцов и субстрат/хромоген не специфичны и могут использоваться для постановки тестов RIDASCREEN EIA на определение антител к другим паразитам.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера развести в 19 частях дистиллированной воды. Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C.

Внесите 50 мл концентрированного промывочного буфера в мерный цилиндр объемом 1000 мл. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой. Готовый промывочный буфер можно хранить в течение 4 недель при температуре 2-8 °C.

9.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите образцы сыворотки крови буфером для разведения образцов 1: 50, например, следующим образом:

10 мкл образца сыворотки крови + 490 мкл буфера для разведения образцов

Внимание! Контроли, входящие в состав набора, готовы к использованию и не требуют разведения.

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов, контролей). Внесите в лунки по 100 мкл положительного контроля, отрицательного контроля (в дубликаты) или разведенных образцов сыворотки крови. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 15 минут.

9.5. Промывка

Отберите содержимое лунок в пустой контейнер с дезинфицирующим раствором. Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Затем промойте все лунки 5 раз, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следите за тем, чтобы промывочное устройство подходило для планшетов этого типа.

9.6. Вторая инкубация

В каждую лунку внесите по 100 мкл (или 2 капли) конъюгата антител к IgG человека. Инкубируйте планшет при комнатной температуре в течение 15 минут.

9.7. Промывка

Промойте планшет 5 раз как описано в пункте 9.5.

9.8. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 50 мкл (или 1 капле) субстрата и по 50 мкл (или 1 капле) хромогена. Инкубируйте планшет в течение 15 минут при комнатной температуре. По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл (или 1 капле) стоп-реагента. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках с помощью планшетного спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

Примечание: при очень высокой концентрации антител в образце пациента в лунках с хромогеном может образовываться темный осадок.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Прогрейте все реагенты до комнатной температуры.
2. Приготовьте промывочный буфер.

3. Разведите образцы сыворотки крови.
4. Внесите в лунки по 100 мкл положительного контроля, отрицательного контроля (в дубликаты) или разведенных образцов; инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре.
5. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 5 раз, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку.
6. Добавьте по 100 мкл (или 2 капли) конъюгата антител к IgG человека; инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое лунок и промойте лунки 5 раз, внося по 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку.
8. Внесите по 50 мкл (или 1 капле) субстрата и 50 мкл (или 1 капле) хромогена; инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте.
9. Добавьте по 50 мкл (или 1 капле) стоп-реагента, измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для контроля качества положительный и отрицательный (в дубли) контроли должны включаться в каждую серию определений. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность (ОП) положительного контроля при 450 нм выше 0,8. Средняя оптическая плотность отрицательного контроля при 450 нм должна быть ниже 0,3. Если оптическая плотность отдельных значений отрицательного контроля отличается от средней оптической плотности более чем на 25%, тест следует повторить.

Если полученные значения отличаются от указанных, если хромоген помутнел или приобрел голубую окраску до внесения в лунки стрипов, можно предположить, что срок годности реагентов истек.

Пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дистрибьютеру.

11. РАСЧЕТ ИНДЕКСА ПРОБЫ

1. Рассчитайте среднюю ОП отрицательного контроля.
2. Прибавьте 0,150 к средней ОП. Полученный результат является cut-off (уровнем отсечения) анализа.
3. Вычислите индекс пробы, разделив ОП образца на значение cut-off.

Например:

отрицательный контроль лунка 1	ОП = 0,115
отрицательный контроль лунка 2	ОП = 0,125
образец	ОП = 0,508

$$\text{значение cut-off} = \frac{0,115 + 0,125}{2} + 0,150 = 0,270$$

$$\text{индекс пробы} = \frac{0,508}{0,270} = 1,88$$

12. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

	отрицательный	неопределенный	положительный
Индекс пробы	< 0,9	0,9 – 1,1	> 1,1

13. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Leishmania Ab специфично выявляет антитела к *Leishmania* (виды: *donovani*, *major*, *mexicana*, *braziliensis*). Ее следует использовать в случаях подозрения на лейшманиоз.

Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клиническим диагнозом и результатами других диагностических исследований.

Неопределенные и слабоположительные результаты могут наблюдаться в следующих случаях:

- Люди были укушены москитами рода *Phlebotomus* в эндемической области, но не заболели. Однако в их организме выработались антитела с низким титром.
- Люди страдают или страдали бессимптомным заболеванием, в связи с чем в их организме все еще сохраняется низкий уровень антител.
- Люди болели лейшманиозом в прошлом, и в их организме все еще сохраняется низкий уровень антител.
- Люди в процессе развития заболевания.
- Неидентифицированные и неспецифические факторы, обуславливающие подобную реакцию.

Необходимо дальнейшее обследование этих людей. Следует исследовать новый свежий образец сыворотки крови, проанализировать клинические симптомы и провести дополнительные тесты. При получении тех же результатов нужно выполнить анализ другого образца сыворотки крови этого пациента через 2 – 4 недели.

Средне и сильно положительные результаты возможны у людей, болеющих лейшманиозом, или болевших недавно, или болевших когда-то, в организме которых сохранились антитела в высоком титре. Необходимо рассматривать эти данные в совокупности с клинической симптоматикой и результатами дополнительных тестов.

Отрицательный результат в целом не исключает лейшманиоз. Из-за низкого титра антител на начальной стадии заболевания, результат теста, проведенного в этот период, может быть отрицательным. Если имеется подозрение на наличие данной инфекции исходя из клинических данных, следует провести анализ другого образца сыворотки крови этого пациента через 2 – 4 недели.

Обнаружено, что в Южной Америке может в некоторых случаях наблюдаться перекрестная реакция в сыворотках, дающих положительные результаты с *T. cruzi* (возбудителем болезни Чагаса). Таким образом, при использовании данной тест-системы в районах Южной Америки, где распространена болезнь Чагаса, следует учитывать возможность таких реакций.

14. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Вариация между постановками (n=5)	IgG	
	ОП	Коэффициент вариации, %
Сыворотка 1	0,241	6,1
Сыворотка 2	0,607	5,5
Сыворотка 3	1,416	5,2

Вариация внутри постановки (n=24)	IgG	
	ОП	Коэффициент вариации, %
Сыворотка 1	0,252	4,2
Сыворотка 2	0,615	3,9
Сыворотка 3	1,427	5,0

Чувствительность и специфичность оценивали по сравнению с двумя другими коммерчески доступными наборами ИФА.

Чувствительность: 95,7%

Специфичность: 95,7%

Результаты исследования 200 образцов сыворотки доноров крови, взятых из центра доноров крови Германии:

	отрицательный	неопределенный	положительный
200 образцов сыворотки	90%	6%	4%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 3 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»

М.И. Прищепа

10 ноября 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения IgG антител к тения солиум
(RIDASCREEN® *Taenia solium* IgG)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® *Taenia solium* IgG

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgG к *Taenia solium* в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест RIDASCREEN® *Taenia solium* IgG – диагностическая иммуноферментная (ИФА) тест-система для качественного определения *in vitro* специфических антител класса IgG к личиночным формам *Taenia solium* в сыворотке крови человека. Тест показан при подозрении на инвазию *Taenia solium* или для определения иммунного статуса организма.

2. ВВЕДЕНИЕ

В результате инвазии *Taenia solium* происходит формирование специфических антител к паразиту, определение которых в сыворотке крови возможно с помощью иммунологических методов. Выбор метода и определяемых патогенспецифических антител имеет важное значение для диагностики. По сравнению с другими серологическими методами (например, РСК) метод ИФА является более чувствительным и специфичным.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител класса IgG к *Taenia solium* основано на двухстадийном непрямом иммуноферментном анализе. Инактивированные растворимые антигены *Taenia solium* сорбированы на поверхности лунок микропланшета. В лунки вносят разведенные образцы сыворотки крови и контроли и инкубируют при комнатной температуре. Имеющиеся в них антитела к *Taenia* связываются с иммобилизованными антигенами. Несвязавшиеся антитела удаляются промывкой. На второй стадии в лунки вносят конъюгированный с пероксидазой белок А. После инкубации несвязавшийся конъюгат удаляется промывкой. В лунки добавляют субстрат (пероксид мочевины) и хромоген (ТМБ) и инкубируют при комнатной температуре. Фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат/хромоген в голубую жидкость. Добавление стоп-реагента меняет ее цвет на желтый. Оптическую плотность измеряют при длине волны 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм). Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate крышка не окрашена	Микропланшет 96-луночный: в рамке-держателе, состоящий из двенадцати 8-луночных стрипов с разделяемыми лунками, покрытых инактивированным антигеном <i>Taenia solium</i> ; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
Diluent крышка не окрашена	Буфер для разведения образцов: фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,1% Kathon CG и 0,1% Твин 20; желтого цвета; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash коричневая крышка	Промывочный буфер: 20х концентрат; фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,5% Kathon CG и 1,5% Твин 20	1 x 50 мл
Control + красная крышка	Положительный контроль: инактивированная сыворотка, содержащая IgG человека; содержит 0,1% Kathon CG; готов к использованию	1 x 1,2 мл
Control - крышка не окрашена	Отрицательный контроль: инактивированная сыворотка, не содержащая IgG человека; содержит 0,1% Kathon CG и 0,1% Твин 20; готов к использованию	1 x 2,5 мл
Conjugate оранжевая крышка	Конъюгат белка А: конъюгированный с пероксидазой хрена белок А; в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,01% метилизотиазолинон, 0,01% бромонитродидоксан, 0,05% проклин 300; готов к использованию	1 x 12 мл
Substrate зеленая крышка	Субстратный раствор: пероксид мочевины; готов к использованию	1 x 6 мл
Chromogen голубая крышка	Хромоген: тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 6 мл
Stop желтая крышка	Стоп-реагент: 0,5 М раствор серной кислоты; готов к использованию	1 x 6 мл
Инструкция по применению		

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Пробирки для разведения образцов
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 10 – 100 мкл и 100 - 1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага
- Таймер
- Контейнер для отходов с 0,5% раствором гипохлорита

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Следует избегать микробной контаминации. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Разведенный промывочный буфер можно хранить в течение 4 недель при температуре 2-8 °С.

Перед использованием все реагенты и стрипы должны быть доведены до комнатной температуры. Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов, не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной. Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застежку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °С.

Хромоген бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если хромоген приобрел голубую окраску, он становится непригодным.

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Проведение анализа требует предварительного обучения персонала лаборатории. При этом необходимо руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях, а также строго следовать инструкции по применению набора.
- Контрольные сыворотки (положительный и отрицательный контроль) были проверены на антитела к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на наличие антигена гепатита В, и при этом показали отрицательные результаты. Однако, как контроли, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Не следует пипетировать ртом образцы или реагенты, необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа.
- Положительный контроль и раствор для разведения образцов содержат 0,1% Kathon CG в качестве консерванта. Следует избегать их контакта с кожей или слизистыми.
- Конъюгат фермента содержит 0,05% проклин 300 в качестве консерванта. Следует избегать его контакта с кожей или слизистыми.
- Пероксид мочевины может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно.
- Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожу, смойте ее большим количеством воды.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C, по меньшей мере, в течение одного часа.
- **ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

7. ПРИЗНАКИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ РАЗРУШЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

Непригодность реагента можно установить по следующим признакам:

- помутнение или окрашивание в голубой цвет бесцветного хромогена до его использования
- оптическая плотность (ОП) отрицательного контроля при 450 нм выше 0,3
- оптическая плотность (ОП) положительного контроля при 450 нм ниже 0,8

8. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Taenia solium IgG предназначена для исследования образцов сыворотки крови человека. После взятия крови необходимо как можно скорее отделить сгусток во избежание гемолиза. Образцы следует хранить в холодильнике или в замороженном виде до момента исследования. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, подвергшихся тепловой обработке, липемических, гемолизированных, желтушных и мутных образцов может привести к получению неверных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразбавленная сыворотка		Разбавленная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	больше одной недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием прогрейте все реагенты и стрипы до комнатной температуры в течение не менее 30 минут. Не извлекайте стрипы из упаковки до того, как они прогреются до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Сразу после использования набор необходимо поместить на хранение при температуре 2-8 °C.

Отбирайте только необходимое для анализа количество реагентов. Не выливайте оставшиеся реагенты обратно во флаконы чтобы не допустить контаминации

Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы.

Промывочный буфер, буфер для разведения образцов и субстрат/хромоген не специфичны и могут использоваться для постановки тестов RIDASCREEN EIA на определение антител к другим паразитам.

9.2. Приготовление промывочного буфера

1 часть концентрированного промывочного буфера [Wash] развести в 19 частях дистиллированной воды. Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C.

Внесите 50 мл концентрированного промывочного буфера в мерный цилиндр объемом 1000 мл. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой. Готовый промывочный буфер можно хранить в течение 4 недель при температуре 2-8 °C.

9.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите образцы сыворотки крови буфером для разведения образцов **Diluent** 1:50, например, следующим образом:

10 мкл образца сыворотки крови + 490 мкл буфера для разведения образцов **Diluent**

Внимание! Контроли, входящие в состав набора, готовы к использованию и не требуют разведения.

9.4. Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 100 мкл положительного контроля, отрицательного контроля или разведенных образцов сыворотки крови. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 15 минут. В каждом анализе рекомендуется отводить по 2 лунки для отрицательного контроля.

9.5. Промывка

Вылейте или аспирируйте содержимое лунок в пустой контейнер с дезинфицирующим раствором. Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Затем промойте все лунки 5 раз, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следите за тем, чтобы промывочное устройство подходило для планшетов этого типа.

9.6. Вторая инкубация

В каждую лунку внесите по 100 мкл (или 2 капли) конъюгата белка А **Conjugate**. Инкубируйте планшет при комнатной температуре в течение 15 минут.

9.7. Промывка

Промойте планшет 5 раз как описано в пункте 9.5.

9.6. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 50 мкл (или 1 капле) субстрата **Substrate** и по 50 мкл (или 1 капле) хромогена **Chromogen**. Инкубируйте планшет в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25 °C). По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл (или 1 капле) стоп-реагента **Stop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измеряют оптическую плотность в лунках с помощью планшетного фотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для контроля качества положительный и отрицательный (в дубле) контроли должны включаться в каждую серию определений. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность (ОП) положительного контроля при 450 нм выше 0,8. Средняя оптическая плотность отрицательного контроля при 450 нм должна быть ниже 0,3. Если оптическая плотность отдельных значений отрицательного контроля отличается от средней оптической плотности более чем на 25%, тест следует повторить.

Если полученные значения отличаются от указанных, если хромоген помутнел или приобрел голубую окраску до внесения в лунки стрипов, можно предположить, что срок годности реагентов истек.

Пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дистрибьютору.

11. РАСЧЕТ ИНДЕКСА ПРОБЫ

- а) Рассчитайте среднюю ОП отрицательного контроля.
- б) Прибавьте 0,150 к средней ОП. Полученный результат является cut-off (уровнем отсечения) анализа.
- с) Вычислите индекс пробы, разделив ОП образца на значение cut-off, полученное в пункте б).

Например: отрицательный контроль 1 ОП = 0,115
 отрицательный контроль 2 ОП = 0,125
 образец ОП = 0,508

$$\text{значение cut-off} = \frac{0,115 + 0,125}{2} + 0,150 = 0,270$$

$$\text{индекс пробы} = \frac{0,508}{0,270} = 1,88$$

12. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таблица 3. Оценка индекса пробы.

	отрицательный	неопределенный	положительный
Индекс пробы	< 0,9	0,9 – 1,1	> 1,1

13. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуноферментная тест-система RIDASCREEN® Taenia solium IgG специфично выявляет антитела к личиночным формам *Taenia solium*. Ее следует использовать в случаях подозрения на цистицеркоз.

Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с клиническим диагнозом и результатами других диагностических исследований.

Выработка антител в ответ на паразитарную инвазию широко варьирует в зависимости от локализации *Taenia* и очень индивидуальна.

Отрицательный результат не исключает цистицеркоз. Из-за низкого титра антител на начальной стадии заболевания, результат теста, проведенного в этот период, может быть отрицательным или сомнительным. Если имеется подозрение на наличие данной инвазии исходя из клинических данных, следует провести анализ другого образца сыворотки крови этого пациента через 2 – 4 недели.

Положительный результат на наличие антител к *Taenia solium* не исключает присутствия в образце других патогенных микроорганизмов.

Перекрестные реакции показаны для антител к *Echinococcus*.

12. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Вариация между постановками (n=5)	IgG	
	ОП	Коэффициент вариации, %
Сыворотка 1	0,282	21,3
Сыворотка 2	0,564	7,8
Сыворотка 3	1,264	10,1

Вариация внутри постановки (n=24)	IgG	
	ОП	Коэффициент вариации, %
Сыворотка 1	0,253	9,0
Сыворотка 2	0,496	7,7
Сыворотка 3	1,036	7,3

Чувствительность и специфичность оценивали по сравнению с двумя другими коммерчески доступными наборами ИФА.

Чувствительность: 100,0%

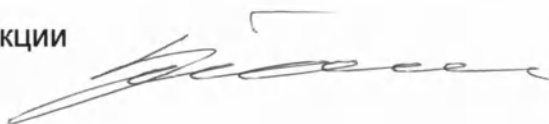
Специфичность: 93,1%

Результаты исследования 200 образцов сыворотки доноров крови, взятых из центра доноров крови Германии:

	отрицательный	неопределенный	положительный
200 образцов сыворотки	92%	4%	4%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 3 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для определения IgG антител к токсокарам
(RIDASCREEN® Toxocara IgG)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)**

RIDASCREEN® Toxocara IgG

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgG к токсокарам в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

RIDASCREEN® Toxocara IgG является иммуноферментной тест-системой для выявления специфических антител класса IgG к токсокарам (*Toxocara canis*) в сыворотке крови человека. Только для *in vitro* диагностики.

2. ВВЕДЕНИЕ

Токсокароз – паразитарное заболевание, вызываемое миграцией личинок нематод *Toxocara*. Хотя род *Toxocara* включает много видов, в том числе *T. cati* (паразитирующая у представителей семейства кошачьих), однако инвазию у человека, как правило, вызывает *T. canis* (паразитирующая у представителей семейства псовых). Роль мигрирующих личинок токсокар до сих пор недооценивалась, по последним же данным именно токсокароз является вторым по массовости гельминтозом в развитых странах.

Обычно заражение происходит при употреблении пищи, загрязненной частицами почвы, содержащей яйца токсокар. Яйца попадают в почву с фекалиями инфицированных кошек или собак (исследования в парках Великобритании показали, что 24% образцов почвы заражено яйцами) и через 1-3 недели созревания становятся инвазионными. Жизнеспособность и инвазионность яиц в почве сохраняется в течение многих месяцев. Высушивание оказывает на них неблагоприятное воздействие. После попадания в кишечник из яиц выходят личинки, которые через слизистую оболочку проникают в кровеносные сосуды и мигрируют в печень и легкие. Из легких часть личинок разносится в другие органы и ткани, повреждая их при миграции, или вызывая образование гранулем.

При заражении личинками токсокар может развиваться как висцеральная, так и глазная формы токсокароза.

Висцеральная форма токсокароза может протекать бессимптомно, сопровождаясь незначительной эозинофилией, или вызывать тяжелое поражение, вплоть до летального исхода. При острой форме наблюдается увеличение печени, гиперглобулинемия, легочной синдром, лихорадка. В тяжелых случаях количество лейкоцитов может увеличиваться до 100 000/мм³ и более, при этом эозинофилы составляют 80 – 90%. Симптомы могут сохраняться в течение одного года и более. Также может развиваться пневмония и неврологические заболевания.

Глазная форма токсокароза также может протекать бессимптомно или вызывать острое поражение глаз, например, эндофтальмит, который способен привести к полной потере зрения, а также повреждение сетчатки глаза, сходное с ретинобластомой, которое часто заканчивается удалением глазного яблока.

Инкубационный период длится от нескольких недель до нескольких месяцев в зависимости от интенсивности инвазии, наличия реинвазии и чувствительности пациента.

Распространен токсокароз, по-видимому, повсеместно. В США и Великобритании этому заболеванию уделяется больше внимания, хотя оно вряд ли встречается здесь чаще, чем в других странах. Тяжелая форма наблюдается время от времени в отдельных семьях, поражая главным образом детей в возрасте от 14 до 40 месяцев, хотя болеют дети и более старшего возраста. В очень редких случаях заражаются взрослые. Это связано с меньшей подверженностью заболеванию взрослых и детей старшего возраста.

Основным источником инвазии являются собаки и кошки. Заражение щенков и котят в основном происходит при передаче личинок через плаценту или через материнское молоко. В возрасте 3 или 4 недель животные начинают выделять яйца с фекалиями.

Обнаружение личинок токсокар при биопсии печени подтверждает клинический диагноз, однако сделать это удается крайне редко.

Поскольку надежный метод диагностики токсокароза отсутствует, невозможно точно установить истинную чувствительность и специфичность серологических тестов. Диагностика осложняется еще и тем, что выработка антител широко варьирует в зависимости от количества и локализации нематод. Однако многочисленные исследования показали, что использование в иммуноанализе очищенного экскреторного антигена, выделенного из личинок, существенно улучшает чувствительность и специфичность метода сравнительно с методами, основанными на использовании неочищенных антигенов.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител класса IgG к токсокарам основано на двухстадийном непрямом иммуноферментном анализе. Специфические очищенные антигены *Toxocara canis* сорбированы на поверхности лунок микропланшета. В лунки вносят разведенные образцы сыворотки крови и контроли и инкубируют при комнатной температуре. Имеющиеся в них антитела к токсокарам связываются с иммобилизованными антигенами. Не связавшиеся антитела удаляются промывкой.

На второй стадии в лунки вносят конъюгированный с пероксидазой белок А. Белок А обладает высокой аффинностью к Fc фрагменту IgG человека. После инкубации несвязавшийся конъюгат удаляется промывкой. В лунки добавляют субстрат (пероксид мочевины) и хромоген (ТМБ) и инкубируют при комнатной температуре. Фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат/хромоген в голубую жидкость. Добавление стоп-реагента меняет ее цвет на желтый. Оптическую плотность измеряют при длине волны 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм). Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

late	Микропланшет 96-луночный: в рамке-держателе, состоящий из двенадцати 8-луночных стрипов с отделяемыми лунками, покрытых очищенным антигеном <i>Toxocara canis</i> ; в запечатывающемся пакете из фольги	96 опред.
Diluent крышка не окрашена	Буфер для разведения образцов: фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,1% Kathon CG и 0,1% Твин 20; желтого цвета; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash коричневая крышка	Промывочный буфер: 20x концентрат; фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,5% Kathon CG и 1,5% Твин 20	1 x 50 мл
Control + красная крышка	Положительный контроль IgG: человеческая сыворотка, содержащая IgG человека; содержит 0,1% Kathon CG; готов к использованию	1 x 1,2 мл
Control - крышка не окрашена	Отрицательный контроль IgG: сыворотка, не содержащая IgG человека; содержит 0,1% Kathon CG и 0,1% Твин 20; готов к использованию	1 x 2,5 мл
Conjugate оранжевая крышка	Конъюгат белка А: конъюгированный с пероксидазой хрена белок А; содержит 0,01% метилизотиазолинон, 0,01% бромонитродидоксан, 0,05% проклин 300; готов к использованию	1 x 12 мл
Substrate зеленая крышка	Субстратный раствор: пероксид мочевины; готов к использованию	1 x 6 мл
Chromogen голубая крышка	Хромоген: тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 6 мл
Stop желтая крышка	Стоп-реагент: 0,5 М раствор серной кислоты; готов к использованию	1 x 6 мл

Инструкция по применению

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Пробирки для разведения образцов
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 10–100 мкл и 100–1000 мкл

- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, оптимальная референтная длина волны ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Контрольные сыворотки (положительный и отрицательный контроль) были проверены на антитела к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на наличие антигена гепатита В, и при этом показали отрицательные результаты. Однако, как контроли, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
2. Пероксид мочевины может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно!
3. Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой.
4. Контроли, промывочный буфер и буфер для разведения образцов в качестве консерванта содержат Kathon CG. Избегайте их контакта с кожей и слизистыми оболочками.
5. Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °С, по меньшей мере, в течение одного часа.
6. Не следует пипетировать ртом образцы или реагенты, необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа
7. Не допускается использование реагентов из наборов других серий.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита

6. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С. После вскрытия их можно использовать до срока годности, указанного на этикетке. Следует избегать микробной контаминации. Качество набора гарантируется только до истечения его срока годности.

Разведенный промывочный буфер можно хранить в течение 4 недель при температуре 2-8 °С.

Перед использованием все реагенты и стрипы должны быть прогреты до комнатной температуры. Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов, не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной. Пакет из фольги следует вскрывать с помощью ножниц, не повредив застежку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °С.

Хромоген бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за аутоокисления. Если хромоген приобрел голубую окраску, он становится непригодным.

7. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

ИФА тест RIDASCREEN® Toxocara IgG предназначен для исследования образцов сыворотки крови человека. После сбора крови необходимо как можно быстрее отделить кровяной сгусток во избежание гемолиза.

Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, подвергшихся тепловой обработке, а также липемических, гемолизированных, желтушных и мутных образцов может привести к получению ложных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразбавленная сыворотка		Разбавленная сыворотка
2-8 °С	-20 °С	2-8 °С
1 неделя	больше одной недели	7 часов

8. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

8.1. Общие замечания

Перед использованием доведите все реагенты и стрипы до комнатной температуры в течение не менее 30 минут. Не извлекайте стрипы из упаковки до того, как они прогреются до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Сразу после использования набор необходимо поместить на хранение при температуре 2-8 °С.

Отбирайте только необходимое для анализа количество реагентов. Не выливайте оставшиеся реагенты обратно во флаконы, чтобы не допустить контаминации

Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы.

Промывочный буфер, буфер для разведения образцов и субстрат/хромоген не специфичны и могут использоваться для постановки тестов RIDASCREEN EIA на определение антител к другим паразитам.

8.2. Приготовление промывочного буфера

Разведите концентрат промывочного буфера **Wash** дистиллированной водой в соотношении 1:20 (1 часть концентрата на 19 частей дистиллированной воды). Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °C.

Внесите 50 мл концентрированного промывочного буфера в мерный цилиндр объемом 1000 мл. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой. Готовый промывочный буфер можно хранить при температуре 2 – 8 °C максимум 4 недели.

8.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите образцы сыворотки крови буфером для разведения образцов **Diluent** в соотношении 1:50, например, следующим образом:

10 мкл образца сыворотки крови + 490 мкл буфера для разведения образцов **Diluent**

Внимание! Контроли, входящие в состав набора, готовы к использованию и не требуют разведения.

8.4. Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 100 мкл положительного контроля **Control +**, отрицательного контроля **Control -** или разведенных образцов сыворотки. Инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) в течение 15 минут. В каждом анализе рекомендуется отводить для отрицательного контроля **Control -** по 2 лунки.

8.5. Промывка

Вылейте или удалите аспирацией содержимое лунок в пустой контейнер с дезинфицирующим раствором. Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Затем промойте все лунки 5 раз, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следите за тем, чтобы промывочное устройство подходило для планшетов этого типа.

8.6. Вторая инкубация

В каждую лунку внесите по 100 мкл (или по 2 капли) конъюгата **Conjugate**. Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25 °C) в течение 15 минут.

8.7. Промывка

Промойте планшет 5 раз как описано выше в пункте 9.5.

8.8. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 50 мкл (или по 1 капле) субстрата **Substrate** и по 50 мкл (или по 1 капле) хромогена **Chromogen**. Инкубируйте планшет в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25 °C).

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл (или 1 капле) стоп-реагента **Stop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измерьте оптическую плотность в лунках с помощью планшетного спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

Примечание: при очень высокой концентрации антител в образце, в лунках с хромогеном может образовываться темный осадок.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для контроля качества положительный и отрицательный (в дубликатах) контроли должны включаться в каждую серию определений. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность (ОП) положительного контроля при 450 нм выше 0,8. Средняя оптическая плотность отрицательного контроля при 450 нм должна быть ниже 0,3. Если результаты отдельных измерений отрицательного контроля отличаются от средней оптической плотности более чем на 25%, тест следует повторить.

Пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа

- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дистрибьютеру.

11. РАСЧЕТ ИНДЕКСА ПРОБЫ

1. Рассчитайте среднюю ОП отрицательного контроля.
2. Прибавьте 0,150 к средней ОП. Полученный результат является cut-off (уровнем отсечения) анализа.
3. Рассчитайте индекс пробы, разделив ОП образца на значение cut-off, полученное в пункте 1).

Пример:

отрицательный контроль (1 лунка)	ОП = 0,115
отрицательный контроль (2 лунка)	ОП = 0,125
образец	ОП = 0,508

$$\text{значение cut-off} = \frac{0,115 + 0,125}{2} + 0,150 = 0,270$$

$$\text{индекс пробы} = \frac{0,508}{0,270} = 1,88$$

12. Интерпретация результатов

Расчет индекса пробы

	отрицательный	неопределенный	положительный
Индекс пробы	< 0,9	0,9 – 1,1	> 1,1

13. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Иммуноферментный тест RIDASCREEN® Toxocara IgG выявляет специфические антитела к *Toxocara canis*. Его следует использовать в случаях подозрения на токсокароз.

При постановке диагноза, наряду с результатами теста, следует принимать во внимание всю совокупность клинических данных.

Выработка антител в ответ на паразитарную инвазию широко варьирует в зависимости от локализации токсокар и очень индивидуальна.

Отрицательный результат не исключает наличие токсокароза. Из-за низкого титра антител на начальной стадии заболевания, результат теста, проведенного в этот период, может быть отрицательным или сомнительным. Если имеется подозрение на наличие данной инвазии, исходя из клинических данных, следует провести анализ другого образца сыворотки крови этого пациента через 2 – 3 недели.

Положительный результат на наличие антител к токсокарам не исключает присутствия в образце других патогенных микроорганизмов.

14. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Вариация между постановками (n=5)	IgG	
	ОП	Коэффициент вариации, %
Сыворотка 1	0,205	14,8
Сыворотка 2	1,282	13,8
Сыворотка 3	1,674	14,2

Вариация внутри постановки (n=24)	IgG	
	ОП	Коэффициент вариации, %
Сыворотка 1	0,163	8,6
Сыворотка 2	0,942	10,2
Сыворотка 3	1,430	7,9

Чувствительность и специфичность оценивали по сравнению с двумя другими коммерчески доступными наборами ИФА.

Чувствительность: 100,0%

Специфичность: 98,4%

Результаты исследования 200 образцов сыворотки доноров крови, взятых из центра доноров крови Германии:

	Отрицательный	Неопределенный	Положительный
200 образцов сыворотки	95%	1%	4%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 3 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Грищепа

«10» ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения IgG антител к трихинеллам
(RIDASCREEN® Trichinella IgG)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Trichinella IgG

Иммуноферментный тест для качественного определения антител класса IgG к *Trichinella spiralis* в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

RIDASCREEN® Trichinella IgG является иммуноферментной тест-системой для выявления специфических антител класса IgG к *Trichinella spiralis* в сыворотке крови человека.

Только для *in vitro* диагностики.

2. ВВЕДЕНИЕ

Трихинеллез – паразитарное заболевание, вызываемое нематодой *Trichinella spiralis*. Заражение происходит при употреблении сырого или подвергшегося недостаточной тепловой обработке мяса. Хотя нематоды встречаются повсеместно у большого числа видов животных, основным источником заражения для населения развитых стран являются домашние и дикие свиньи.

Клинические признаки трихинеллеза обычно неспецифичны и включают лихорадку, боль в мышцах, отек тканей вокруг глазниц и конъюнктивит, тошноту, рвоту или диарею, а также эозинофилию.

Постановка диагноза возможна при обнаружении личинок в пораженной мышечной ткани. Уточнить его удастся с увеличением числа паразитов и максимальным развитием личинок (через 30 дней после употребления зараженного мяса).

Серологические методы исследования также очень важны при постановке диагноза трихинеллеза. Помимо других методов, таких как латексная агглютинация (ЛА) и непрямая гемагглютинация (НГА), получил развитие и метод иммуноферментного анализа (ИФА), благодаря своей чувствительности и специфичности. Экскреторно-секреторный (ЭС) антиген, выделенный из личинок зараженных свиней, оказался высокоспецифичным к *Trichinella spiralis* и пригодным для использования в ИФА.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение антител класса IgG к *Trichinella spiralis* основано на двухстадийном непрямом иммуноферментном анализе. Специфические очищенные антигены *Trichinella spiralis* сорбированы на поверхности лунок микропланшета. В лунки вносят разведенные образцы сыворотки крови и контроли и инкубируют при комнатной температуре. Имеющиеся в них антитела к *Trichinella spiralis* связываются с иммобилизованными антигенами. Не связавшиеся антитела удаляются промывкой.

На второй стадии в лунки вносят конъюгированный с пероксидазой белок А. Белок А обладает высокой аффинностью к Fc фрагменту IgG человека. После инкубации не связавшийся конъюгат удаляется промывкой. В лунки добавляют субстрат (перекись мочевины) и хромоген (ТМБ) и инкубируют при комнатной температуре. Фермент, связавшийся с поверхностью лунок, преобразует бесцветный субстрат/хромоген в голубую жидкость. Добавление стоп-реагента меняет ее цвет на желтый. Оптическую плотность измеряют при длине волны 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм). Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет 96-луночный: в рамке-держателе, состоящий из двенадцати 8-луночных стрипов с разделяемыми лунками, покрытых антигеном <i>Trichinella spiralis</i> ; в герметичной упаковке с влагопоглотителем	96 опред.
Diluent крышка не окрашена	Буфер для разведения образцов: фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,1% Kathon CG и 0,1% Твин 20; желтого цвета; готов к использованию	1 x 100 мл
Wash оранжевая крышка	Промывочный буфер: 20x концентрат; фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0,5% Kathon CG и 1,5% Твин 20	1 x 50 мл
Control+ красная крышка	Положительный контроль IgG: сыворотка, содержащая IgG человека; содержит 0,1% Kathon CG; готов к использованию	1 x 1,2 мл
Control- крышка не окрашена	Отрицательный контроль IgG: сыворотка, не содержащая IgG человека; содержит 0,1% Kathon CG и 0,1% Твин 20; готов к использованию	1 x 2,5 мл
Conjugate оранжевая крышка	Конъюгат белка А: конъюгированный с пероксидазой хрена белок А; в стабилизирующем белковом растворе; содержит 0,01% метилизотиазолинон, 0,01% бромонитродиоксан, 0,05% проклин 300; готов к использованию	1 x 12 мл
Substrate зеленая крышка	Субстрат: пероксид мочевины; готов к использованию	1 x 6 мл
Chromogen голубая крышка	Хромоген: тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию	1 x 6 мл
Stop желтая крышка	Стоп-реагент: 0,5 М раствор серной кислоты; готов к использованию	1 x 6 мл

Инструкция по применению

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Пробирки для разведения образцов
- Вортекс
- Микропипетки, позволяющие отбирать объемы 10–100 мкл и 100–1000 мкл
- Мерный цилиндр объемом 1000 мл
- Устройство для промывки планшетов или многоканальная пипетка
- Планшетный спектрофотометр (длина волны 450 нм, оптимальная референтная длина волны ≥ 620 нм)
- Фильтровальная бумага

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Контрольные сыворотки (положительный и отрицательный контроль) были проверены на антитела к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на наличие антигена гепатита В, и при этом показали отрицательные результаты. Однако, как контроли, так и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
2. Перекись мочевины может вызывать ожог. Обращайтесь с реагентом осторожно!
3. Стоп-реагент содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте его контакта с кожей и одеждой!
4. Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °С, по меньшей мере, в течение одного часа.
5. Контроли, промывочный буфер и буфер для разведения образцов в качестве консерванта содержат Kathon CG. Избегайте их контакта с кожей и слизистыми оболочками.
6. Не следует пипетировать ртом образцы или реагенты, необходимо предотвращать их контакт с кожей или слизистыми. При работе с образцами следует надевать одноразовые перчатки, после проведения анализа – вымыть руки. Не курите, не ешьте и не пейте в месте проведения анализа
7. Не допускается использование реагентов из наборов других серий.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения образования ядовитых газообразных веществ жидкие отходы, содержащие кислоту, следует нейтрализовать, прежде чем добавлять раствор гипохлорита.

6. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С. После вскрытия их можно использовать до срока годности, указанного на этикетке. Следует избегать микробной контаминации. Качество набора гарантируется только до истечения его срока годности.

Разведенный промывочный буфер можно хранить в течение 4 недель при температуре 2-8 °С.

Перед использованием все реагенты и стрипы должны быть прогреты до комнатной температуры. Во избежание конденсации влаги внутри лунок стрипов, не извлекайте стрипы из фольгированного пакета, пока его температура не достигнет комнатной. Пакет из фольги следует вскрыть с помощью ножниц, не повредив застёжку. Неиспользованные стрипы вложите в пакет, запечатайте его и храните только при температуре 2-8 °С.

Хромоген бесцветен, его следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за аутоокисления. Если хромоген приобрел голубую окраску, он становится непригодным.

7. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

ИФА тест RIDASCREEN® Trichinella IgG предназначен для исследования образцов сыворотки крови человека. После сбора крови необходимо как можно быстрее отделить кровяной сгусток во избежание гемолиза.

Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, подвергшихся тепловой обработке, а также липемических, гемолизированных, желтушных и мутных образцов может привести к получению ложных результатов.

Таблица 1. Хранение образцов.

Неразбавленная сыворотка		Разбавленная сыворотка
2-8 °С	- 20 °С	2-8 °С
1 неделя	больше одной недели	7 часов

8. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

8.1. Общие замечания

Перед использованием доведите все реагенты и стрипы до комнатной температуры в течение не менее 30 минут. Не извлекайте стрипы из упаковки до того, как они прогреются до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Сразу после использования набор необходимо поместить на хранение при температуре 2-8 °С.

Отбирайте только необходимое для анализа количество реагентов. Не выливайте оставшиеся реагенты обратно во флаконы, чтобы не допустить контаминации.

Стрипы можно использовать только однократно. Нельзя использовать стрипы и реагенты, если была повреждена упаковка или протекли флаконы.

Промывочный буфер, буфер для разведения образцов и субстрат/хромоген не специфичны и могут использоваться для постановки тестов RIDASCREEN EIA на определение антител к другим паразитам.

8.2. Приготовление промывочного буфера

Разведите концентрат промывочного буфера дистиллированной водой в соотношении 1:20 (1 часть концентрата на 19 частей дистиллированной воды). Кристаллы в концентрате буфера можно растворить, поместив флакон в водяную баню при 37 °С.

Внесите 50 мл концентрированного промывочного буфера **Wash** в мерный цилиндр объемом 1000 мл. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой. Готовый промывочный буфер можно хранить при температуре 2-8 °С в течение срока годности набора, указанного на этикетке флакона.

8.3. Подготовка образцов

Перед проведением анализа разведите образцы сыворотки крови буфером для разведения образцов **Diluent** в соотношении 1:50, например, следующим образом:

10 мкл образца сыворотки крови + 490 мкл буфера для разведения образцов **Diluent**

Внимание! Контроли, входящие в состав набора, готовы к использованию и не требуют разведения.

8.4. Первая инкубация

Поместите в рамку необходимое количество лунок (для образцов и контролей). Внесите в лунки по 100 мкл положительного контроля **Control +**, отрицательного контроля **Control -** или разведенных образцов сыворотки. Инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °С) в течение 15 минут. В каждом анализе рекомендуется отводить для отрицательного контроля **Control -** по 2 лунки.

8.5. Промывка

Вылейте или удалите аспирацией содержимое лунок в пустой контейнер с дезинфицирующим раствором. Удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу. Затем промойте все лунки 5 раз, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следите за тем, чтобы промывочное устройство подходило для планшетов этого типа.

8.6. Вторая инкубация

В каждую лунку внесите по 100 мкл (или по 2 капли) конъюгата **Conjugate**. Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25 °C) в течение 15 минут.

8.7. Промывка

Промойте планшет 5 раз как описано выше в пункте 9.5.

8.6. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 50 мкл (или по 1 капле) субстрата **Substrate** и по 50 мкл (или по 1 капле) хромогена **Chromogen**. Инкубируйте планшет в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25 °C).

По окончании инкубации остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл (или 1 капле) стоп-реагента **Stop**. После осторожного перемешивания (легким постукиванием по ребру планшета) измерьте оптическую плотность в лунках с помощью планшетного спектрофотометра при 450 нм (оптимальное значение референтной длины волны ≥ 620 нм).

Примечание: при очень высокой концентрации антител в образце, в лунках с хромогеном может образовываться темный осадок.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Для контроля качества положительный и отрицательный (в дубликатах) контроли должны включаться в каждую серию определений. Результаты анализа могут считаться достоверными, если оптическая плотность (ОП) положительного контроля при 450 нм выше 0,8. Средняя оптическая плотность отрицательного контроля при 450 нм должна быть ниже 0,3. Если результаты отдельных измерений отрицательного контроля отличаются от средней оптической плотности более чем на 25%, тест следует повторить.

Пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- срок годности используемых реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстратный раствор нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после перестановки анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дистрибьютеру.

11. Расчет индекса пробы

1. Рассчитайте среднюю ОП отрицательного контроля.
2. Прибавьте 0,150 к средней ОП. Полученный результат является cut-off (уровнем отсечения) анализа.
3. Рассчитайте индекс пробы, разделив ОП образца на значение cut-off, полученное в пункте 1).

Пример:

отрицательный контроль (1 лунка)	ОП = 0,115
отрицательный контроль (2 лунка)	ОП = 0,125
образец	ОП = 0,508

$$\text{значение cut-off} = \frac{0,115 + 0,125}{2} + 0,150 = 0,270$$

$$\text{индекс пробы} = \frac{0,508}{0,270} = 1,88$$

12. Интерпретация результатов**Таблица 2.** Расчет индекса пробы.

	Отрицательный	Неопределенный	Положительный
Индекс пробы	< 0,9	0,9 – 1,1	> 1,1

13. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Иммуноферментный тест RIDASCREEN® Trichinella IgG позволяет определять специфические антитела к *Trichinella spiralis*. Его следует использовать в случаях подозрения на трихинеллез.

При постановке диагноза, наряду с результатами теста, следует принимать во внимание всю совокупность клинических данных.

Интенсивность выработки антител в ответ на паразитарную инвазию широко варьирует, в зависимости от локализации трихинелл, и очень индивидуальна.

Отрицательный результат не исключает наличие трихинеллеза. Из-за низкого титра антител на начальной стадии заболевания, результат теста, проведенного в этот период, может быть отрицательным или неопределенным. Если на основании клинических данных имеется подозрение на наличие инфекции *Trichinella spiralis*, следует провести анализ другого образца сыворотки этого пациента через 2 – 3 недели.

Положительный результат на наличие антител к *Trichinella spiralis* не исключает присутствия в образце других патогенных микроорганизмов.

14. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Вариация между постановками (n=5)	IgG	
	ОП	Коэффициент вариации, %
Сыворотка 1	0,073	15,2
Сыворотка 2	0,446	9,1
Сыворотка 3	1,759	7,7

Вариация внутри постановки (n=24)	IgG	
	ОП	Коэффициент вариации, %
Сыворотка 1	0,057	12,3
Сыворотка 2	0,419	6,8
Сыворотка 3	1,626	6,0

Чувствительность и специфичность оценивали по сравнению с двумя другими коммерчески доступными наборами ИФА.

Чувствительность: 100,0%

Специфичность: 100,0%

Результаты исследования 200 образцов сыворотки доноров крови, взятых из центра доноров крови Германии:

	Отрицательный	Неопределенный	Положительный
200 образцов сыворотки	100%	0%	0%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 3 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

«10» ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Абсорбент ревматоидного фактора
(RIDA® RF-Absorbens)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDA® RF-Absorbens

Антитела к иммуноглобулинам G человека для абсорбции ревматоидного фактора в сыворотке и плазме крови человека.

Набор рассчитан на 50 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор RIDA® RF-Absorbens предназначен для преципитации IgG антител и ревматоидного фактора в сыворотке и плазме крови человека. Только для *in vitro* диагностики.

2. ВВЕДЕНИЕ

При инфицировании количество вырабатываемых организмом человека специфических IgG-антител значительно превышает количество антител класса IgM. Исключение составляет только ранняя фаза иммунного ответа. Из-за избытка IgG-антител и их большей аффинности к антигенам эти антитела могут затруднять определение IgM-антител. Блокирование эпитопов IgG-антителами может вызывать ложноотрицательные результаты при определении IgM-антител.

С другой стороны, ревматоидный фактор, который обнаруживается у 20% населения, может приводить к ложноположительным результатам при определении IgM-антител. Ревматоидный фактор представляет собой, главным образом, IgM-антитела к F_c-фрагменту IgG антител. После специфического связывания IgG-антител с определяемым антигеном ревматоидные факторы могут связываться с их F_c-фрагментом. При добавлении ферментного конъюгата (антител к иммуноглобулинам IgM человека) последний свяжется с ревматоидным фактором, вследствие чего будет получен ложноположительный результат на присутствие IgM-антител.

Таким образом, для правильного определения антител класса IgM рекомендуется абсорбировать из образцов сыворотки крови IgG-антитела. Набор RIDA® RF-Absorbens содержит компоненты, обеспечивающие преципитацию IgG-антител и предупреждающие их влияние на результаты исследования.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор RIDA® RF-Absorbens содержит антитела к IgG человека. В образцах сыворотки крови человека они образуют иммунный комплекс с IgG-антителами и ревматоидным фактором (при его наличии в сыворотке), исключая, таким образом, их негативное влияние на результаты иммунологических исследований.

Связывающая емкость адсорбента составляет 15 мг IgG на мл образца. Благодаря этому обеспечивается быстрая преципитация более 98% IgG-антител.

4. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

RIDA® РФ-Абсорбент: антитела к IgG человека; содержат < 0,1% азиды натрия

5 мл

Инструкция по применению

1

5. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА:

- Пробирки для анализа
- Вортекс
- Мерный цилиндр
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 10 - 100 мкл и 100 - 1000 мкл

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Абсорбент содержит азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить возможный контакт этого реагента с кожей и слизистыми. Взаимодействие его со свинцовыми и медными частями водопроводной системы может привести к образованию взрывоопасных металлических азидов.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавировать при 121 °C не менее 1 часа.

Нельзя использовать реагент, если флакон поврежден или подтекает.

7. ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

Абсорбент необходимо хранить при 2-8 °C и использовать только до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона. Перед использованием абсорбент необходимо прогреть до комнатной температуры (20-25 °C). Необходимо исключить микробное загрязнение. После истечения срока годности абсорбента качество набора не гарантируется.

8. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

8.1 Предварительные комментарии

Работу с абсорбентом должен выполнять только опытный лабораторный персонал. Пожалуйста, ознакомьтесь с правилами техники безопасности, принятыми в медицинских лабораториях. Необходимо строго соблюдать изложенную процедуру исследования.

Перед использованием прогрейте реагент до комнатной температуры (20-25 °C) и хорошо его перемешайте.

8.2 Абсорбция

Для проведения абсорбции необходимо приготовить рабочий раствор буфера для абсорбции путем разведения абсорбента 1:10 в буфере для анализа RIDASCREEN® ELISA. Например: 1 мл RIDA® RF-Absorbens + 9 мл буфера = 10 мл буфера для абсорбции.

Буфер для абсорбции можно хранить при 2-8 °C в течение одной недели. Разведение образцов для анализа следует проводить согласно инструкции для определения антител IgM. Для полной абсорбции инкубируйте разведенный образец в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25 °C). Для получения разведения образца 1:100 рекомендуется следующая процедура:

10 мкл образца + 990 мкл буфера для абсорбции

Примечание: Буфер для абсорбции не должен применяться для разведения образцов для определения антител IgG.

Альтернативная процедура использования RIDA® RF-Absorbens с наборами других производителей.

Поместите 100 мкл RIDA® RF-Absorbens в чистую пробирку и добавьте с помощью пипетки 10 мкл сыворотки. Быстро перемешайте и оставьте инкубироваться при комнатной температуре на 15 минут. После этого образец сразу же можно использовать в исследовании или, при необходимости, оставить на ночь в холодильнике до проведения анализа.

В процессе абсорбции образец разводится 1:11. При исследовании образца иммунологическими тестами необходимо соблюдать конечное разведение, поэтому, при необходимости, образец можно дополнительно развести соответствующим буфером (см. таблицу 1).

Таблица 1. Адсорбция и разведение образцов.

RIDA® RF-Absorbens	Образец сыворотки	Разведение сыворотки
100 мкл	10 мкл	1:11
Перемешайте и подождите 15 мин		
	Добавление буфера для разведения	Окончательное разведение
	90 мкл	1:20
	100 мкл	1:21
	390 мкл	1:50
	400 мкл	1:51
	890 мкл	1:100
	900 мкл	1:101
	1890 мкл	1:200
	1900 мкл	1:201

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 2 листов.

