



## Набор ИФА для определения антител класса IgG к вирусу Эхинококка

Кат. № : 3472  
Количество : 96  
Производитель : DRG (Германия)

Методика от 11-2009  
Версия 8.0

**Внимание:** основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Набор иммуноферментного анализа DRG Echinococcus IgG предоставляет материалы для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к вирусу Эхинококка в сыворотке.

Данный набор предназначен исключительно для диагностики *in vitro*.

Эхинококк – это микроскопическая цестода (ленточный червь) длиной от 1,4 до 6 мм, который, в зависимости от типа, встречается у:

- Собак или других собачьих (*E. Granulosus*, однокамерный эхинококкоз)
- Или лисов, койотов и волков (*E. Multilocularis*, многокамерный эхинококкоз)

Источником инфекции является окончательный хозяин (напр. собаки для *E. Granulosus* и в основном лисы для *E. multilocularis*), а также еда, зараженная яйцами паразитов.

После попадания промежуточного хозяина в организм человека через органы пищеварения, яйца вылупливаются в тонкой кишке и вырабатывают онкосферу, которая проникает в стенку кишечника, а через систему кровообращения – в другие органы, где она развивается в кисту. Инфекция эхинококка может много лет пребывать в латентной форме, пока увеличенные кисты не спровоцируют симптомы в пораженных органах.

Личинки *E. granulosus* (онкосферы) в основном начинают пузырится в печени, но также в легких и других органах (в 20% случаев). Паразиты формируют сферические, однокамерные, наполненные жидкостью кисты и могут достигать от 1 до 15 см в диаметре.

В отличие от эхинококкоза мочевого пузыря, личинки *E. Multilocularis* встречаются в большинстве случаев в печени, но вторичным поражением метастазами могут быть задеты другие органы (легкие, почки, ЦНС и др.). Питающая ткань, пораженная паразитами, становится инфильтративной и опухолеподобной.

*E. granulosus* встречается практически во всем мире.

*E. multilocularis* встречается в северном полушарии, включая центральную Европу и северные части Европы, Азии и Северной Америки.

Обнаруживаемые иммунные реакции связывают с местонахождением, целостностью и жизнеспособностью личиночной кисты.

Кисты в печени более склонны к антителогенезу, нежели кисты в легких и, независимо от местонахождения, тесты на обнаружение антител наименее чувствительны у пациентов с цельными гиалиновыми кистами. Кисты в легких, мозгу и селезенке связывают с пониженной серодиагностической реактивностью, тогда как кисты в костях регулярно стимулируют выявляемое антитело. Бороздчатость или разрыв кисты сопровождается резкой стимуляцией антител.

Разграничение между двумя видами эхинококка невозможно.

### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG Echinococcus IgG ELISA является твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA).

Микротитровальные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигеном вируса Эхинококка.

Разбавленные образцы пациентов и готовые к использованию контроли пипетируются в эти лунки. Во время инкубации специфичные к вирусу Эхинококка антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После этапа промывки, для удаления несвязанного образца и контрольного материала, в эти лунки добавляются анти-человеческие IgG антитела к вирусу Эхинококка, конъюгированные пероксидазой хрена. Во время второй инкубации этот анти-IgG конъюгат связывается только с IgG антителами, в результате чего формируются энзим-связанные иммунные комплексы.

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

Интенсивность этого окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце вируса Эхинококка специфичных IgG антител в образце пациента. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA считывателе.

### 3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для использования в диагностике *in vitro*.
- Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ I/II, поверхностному антигену гепатита В и вирусу гепатита С. Однако, во время использования и уничтожения все реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные.
- Контроли и стандарты в культурах клеток оказались неинфекционными.
- Избегайте контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Он может вызывать раздражение кожи и ожоги.
- Никогда не раскапывайте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курите, не принимайте пищу, не пейте и не наносите косметику на территории, где обрабатываются образцы или реагенты набора.
- Надевайте одноразовые перчатки из латекса при обработке образцов и реагентов. Микробиологическое заражение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.
- Обращение должно соответствовать процедурам, указанным в соответствующих государственных руководствах или правилах по биологической безопасности.
- Не используйте реагенты после даты истечения срока годности, которая указана на этикетках набора.
- Согласно протокола анализа необходимо следовать всем рабочим объемам реагентов.
- Оптимальные результаты анализа можно получить только при использовании откалиброванных дозаторов и микротитровальных планшеточных считывателей.
- Не смешивайте и не используйте компоненты наборов с различными номерами партий. Рекомендуется не заменять лунки различных планшетов, даже одной и той же партии. Возможно, что наборы поставались и хранились в различных условиях, и связывающие качества планшетов могут в некоторой степени отличаться.
- Исходя из соответствующих государственных руководств или правил по биологической безопасности, химические вещества, и подготовленные или использованные реагенты должны рассматриваться как опасные отходы.
- За информацией относительно опасных веществ, входящих в набор, просьба обращаться к Спецификациям Безопасности Материала. Спецификации Безопасности Материала предоставляются по запросу непосредственно от компании DRG Instruments GmbH. Спецификации Безопасности Материала соответствуют требованиям ЕС-Руководства 91/155 ЕС.

### 4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

#### 4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки** 12x8 (делимые) полоски, 96 лунок; Лунки покрыты антигеном вируса Эхинококка (вкл. 1 держатель для полосок и 1 пленку для накрывания).
2. **Раствор для разбавления образцов \*\*\***, 1 флакон, 100 мл, готов к использованию, зеленого цвета; pH 7.2 ± 0.2.
3. **Положительный контроль\*\*\***, 1 флакон, 1,0 мл готов к использ., желтого цвета, красный колпачок.
4. **Отрицательный контроль\*\*\***, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использ., желтого цвета, желтый колпачок.
5. **Cut-off контроль\*\*\***, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использ., желтого цвета, черный колпачок.
6. **Ферментный конъюгат\*\***, 1 флакон, 20 мл готов к использ., красного цвета, антитела к человеческому IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена.

7. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл готов к исполъз., ТМВ.
8. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл готов к исполъз., содержит 0,2 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
*Избегайте контакта со стоп раствором. От может вызвать раздражения кожи и ожоги.*
9. **Промывочный раствор\***, 1 флакон, 30 мл (концентрация 20х для 600 мл); pH 7.2 ± 0.2 см. „Подготовка реагентов“.
- \*⇒ содержит 0.03 % ProClin 300  
 \*\*⇒ содержит 0.3 % ProClin 300+0.01 % гентамицина сульфата  
 \*\*\*⇒ содержит 0.03 % ProClin 300+0.015 % 5-бромо-5-нитро-1.3-диоксан (BND) + 0.010 % 2-метил-2Н-изотиазол-3-один (MIT).

#### 4.1.1 Необходимые но не поставляемые материалы

- Микротитровальный планшетный откалиброванный считыватель (450/620нм +/- 10нм).
- Откалиброванные микропипетки разного объема.
- Инкубатор на 37°C.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Вихревой трубочный смеситель.
- Деионизированная или (только что) дистиллированная вода.
- Таймер.
- Абсорбирующая бумага.

#### 4.2 Хранение и стабильность набора

При температуре хранения от 2 до 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты не использовать. Открытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2-8°C. Как только пакет из фольги был открыт, следует быть внимательным чтобы его снова плотно закрыть. Вскрытые наборы сохраняют активность в течение 4 месяцев при соблюдении вышеуказанных условий хранения.

#### 4.3 Подготовка реагентов

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

##### Промывочный раствор

Разбавить промывочный раствор **1+19** (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистиллированной водой. Потребление: ~5 мл на определение. Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °C на водяной бане. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 4 недель при 2+8°C.

#### 4.4 Уничтожение набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с государственными правилами. Специальная информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в данной инструкции).

#### 4.5 Поврежденные наборы

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

### 5. ОБРАЗЦЫ

В данном исследовании может использоваться сыворотка. Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

#### 5.1 Забор образцов

##### Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре. Не центрифугировать пока не произошло полное свертывание. Для пациентов, проходящих

антикоагуляционную терапию может потребоваться больше времени для свертывания.

#### 5.2 Хранение образцов

Перед анализом образцы должны храниться накрытыми и могут храниться в течение 24 часов при температуре 2-8°C. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°C. Размороженные образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

#### 5.3 Разбавление образцов

Перед анализом каждый образец пациента разбавьте **1+100**. Напр., 10 мкл образца + 1 мл раствора для разбавления. **Хорошо смешать. Оставить по крайней мере на 15 минут и хорошо перемешать снова.**  
**Внимание:** Контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

### 6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

#### 6.1 Общие замечания

- Внимательно прочитайте протокол перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от четкого следования описанному протоколу анализа.

- **Очень важно перед началом процедуры анализа все реагенты, образцы и контроли довести до комнатной температуры.**

- Как только начался анализ, все этапы должны быть завершены без прерывания.

- Во избежание перекрестного загрязнения, используйте новые одноразовые пластмассовые наконечники для каждого стандарта, контроля или образца.

- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, снять крышки, установить лунки в рамку и т.д. Это обеспечит равномерное распределение времени для каждого этапа пипетирования без остановки.

- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

- Чтобы избежать испарения и микробиологического загрязнения, плотно закройте флаконы с реагентами непосредственно после их использования.

- После первого вскрытия и последующего хранения проверьте конъюгат и флаконы контролей на микробиологическое загрязнение для дальнейшего использования.

- Во избежание перекрестного загрязнения и ошибочно высоких результатов, раскапывайте образцы пациентов и распределяйте конъюгат на дно лунок аккуратно без разбрызгивания.

- Во время инкубации накрывайте микротитровальные полоски фольгой, чтобы избежать испарения.

#### 6.2 Процедура анализа

Перед началом проведения анализа, разведите промывочный раствор, подготовьте образцы пациента, как описано в п. 5.3., хорошо смешайте перед пипетированием и составьте тщательный для всех образцов и контролей **план распределения и идентификации**, вложенный в набор.

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

Разместите по крайней мере:

1 лунку (напр., A1)	для бланка субстрата,
1 лунку (напр., B1)	для отрицательного контроля,
2 лунки (напр., C1+D1)	для Cut-off контроля и
1 лунку (напр., E1)	для положительного контроля.

На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.

2. Раскапать:

100 мкл	отрицательного контроля в лунку B1
100 мкл	Cut-off контроля в лунки C1 и D1
100 мкл	положительного контроля в лунку E1 и
100 мкл	<b>каждого предварительно обработанного образца новыми одноразовыми наконечниками</b> в соответствующие лунки.

*Оставить лунку A1 для бланка субстрата!*

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

4. Резко вытряхните содержимое лунок.

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

**Примечание:**

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

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

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

7. Резко встряхните содержимое лунок.

Промойте их **5 раз** разбавленным *промывочным раствором (300 мкл/лунку)*. Резко встряхните лунки на абсорбирующую бумагу, чтобы дали остатки жидкости.

8. Добавить по **100 мкл раствора субстрата во все** лунки

9. Накрыть лунки фольгой. Инкубировать: **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ÷ 25 °C) в темноте**.

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

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

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

### 6.3 Измерение

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

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

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

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

## 7. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 7.1 Оценка процесса анализа

Постановка анализа может считаться действительной при соблюдении следующих условий:

- **Бланк субстрата в A1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.100**.
- **Отриц. контроль в B1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.200**.
- **Cut-off контроль в C1/D1:** ⇒ значение абсорбции между **0.350-0,850**.
- **Положит. контроль in E1:** ⇒ значение абсорбции более **0.600**.

### 7.2 Вычисление

#### Среднее значение абсорбции "Cut-off" контроля [CO]

Рассчитать среднее значение абсорбции 2 определений Cut-off контроля (напр., в C1/D1).

**Пример:**  $(0.44 + 0.46) \div 2 = 0.45 = CO$

### 7.3 Интерпретация

Средние значения абсорбции образцов пациента более чем на 10 % больше CO  
(Средняя ОП<sub>пациент</sub> > 1.1 x CO)  
**ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ**

(Средние) значения абсорбции пациентов от 10 % выше до 10 % ниже CO  
повторить анализ 2 - 4 недели спустя на **новых** образцах пациентов  
( $0,9 \times CO \leq \text{Средняя ОП}_{\text{пациент}} \leq 1,1 \times CO$ )  
**СЕРАЯ ЗОНА**

результат второго анализа опять в «серой зоне»  
**ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ**

(Средние) значения абсорбции пациента более чем на 10 % ниже CO  
(Средняя ОП<sub>пациент</sub> < 0.9 x CO)  
**ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ**

### 7.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

(Среднее) значение абсорбции пациента x 10  
\_\_\_\_\_ = [DRG единицы = DU]

CO

1.580 x 10

Пример: \_\_\_\_\_ = 35 DU  
0.45

### Интерпретация результатов

Значение Cut-off:	10	DU
Серая зона:	9 - 11	DU
Отрицательный:	< 9	DU
Положительный:	> 11	DU

## 8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

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

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

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

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

## 9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

### 9.1 Диагностическая специфичность

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

Составляет 100%.

### 9.2 Диагностическая чувствительность

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

Составляет 97%.

## 10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

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

### 10.1. Важные моменты в интерпретации результатов анализа с помощью набора DRG Echinococcus IgG ELISA

Позитивные результаты у пациентов, не обнаруживающих симптомов, означают инфицирование Эхинококком.

Ложноположительные результаты могут возникнуть у пациентов с иными глистными инфекциями, раком или хроническими иммунными расстройствами.

Отрицательные результаты анализа не исключают наличия эхинококка.

Для подтверждения диагноза необходимы эпидемиологические, клинические и биологические выводы в совокупности с методами получения изображений.

Серологическое послеоперационное наблюдение за пациентами характеризуется повышением количества специфических антител IgG на протяжении 4-6 недель после операции, после чего их количество медленно сокращается на протяжении последующих 12-18 месяцев.

## 11. ЮРИДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

### 11.1 Достоверность результатов

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

### 11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения не должны базироваться только на результатах лабораторных исследований, даже если они считаются достоверными согласно п. 11.1. Любой результат является только частью общей клинической картины пациента.

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

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

### 11.3 Ответственность

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

Претензии в случаях неправильного использования набора лабораторией исходя из п. 11.2 тоже не могут являться действительными. Несмотря на это, в случае любой претензии, ответственность производителя не может превышать стоимости набора. Производитель не несет ответственности за любое повреждение набора, случившееся вследствие его неправильной транспортировки.

## 12. ЛИТЕРАТУРА

(см. оригинал инструкции на англ. языке)

### **ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
Тел.: (0342) 775122  
Тел/факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)