

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления низкоавидных
иммуноглобулинов G к вирусу кори
"БиоПрайм-Корь"

Е-0863 **БиоПрайм-Корь**

Настоящая инструкция распространяется на тест-систему иммуноферментную для выявления низкоавидных иммуноглобулинов G к вирусу кори, которая представляет собой набор реагентов для иммуноферментного анализа (ИФА), включающий следующие компоненты:

1) иммуносорбент - полистироловые планшеты для иммунологических реакций, в лунках которых сорбированы антигены вируса кори (АгКорь - в рядах планшета А, С, Е, G) и контрольный антиген (КАг - в рядах В, D, F, H). АгКОРЬ представляют собой инфицированные вирусом кори клетки Vero, КАг представляет собой экстракт незараженных клеток Vero ;

2) положительный контрольный образец (К+НАТ) - сыворотка крови человека от больного корью, содержащая низкоавидные иммуноглобулины G к вирусу кори, сухая или жидкая;

3) положительный контрольный образец (К+ВАТ) - сыворотка крови человека от больного корью, содержащая высокоавидные иммуноглобулины G к вирусу кори, сухой или жидкий;

4) отрицательный контрольный образец (К-) - сыворотка крови человека или сывороточный альбумин человека, не содержащие антител к вирусу кори, сухой или жидкий;

К+НАТ, К+ВАТ, К-:

а) аморфные порошки белого или светло-розового цвета, гигроскопичны,

б) опалесцирующая прозрачная жидкость розового (К+) или голубого(К-) цвета;

5) конъюгат - антитела диагностические против иммуноглобулинов человека, меченные пероксидазой хрена:

прозрачная жидкость;

6) субстратная буферная смесь с гидроперитом (БСГ) - для приготовления раствора хромогена:

прозрачная жидкость (готовая к употреблению);

7) Хромоген (тетраметилбензидин-ТМБ):

прозрачная жидкость.

8) стабилизатор (СТ):

непрозрачная жидкость белого или желтоватого цвета;

9) концентрат (25х) раствора №1 - для отмывания планшетов и приготовления разведений сывороток и конъюгата (концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином):

прозрачная или опалесцирующая пенящаяся жидкость; при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при 35-37 °С в течение 30 минут.

10) раствор №5 - для обработки сывороток:

прозрачная или опалесцирующая пенящаяся жидкость; при хранении возможно помутнение раствора и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при 35-37 °С в течение 30 минут.

11) стоп-реагент- прозрачная жидкость.

Тест-система рассчитана на проведение 48 анализов, включая контрольные.

НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментная тест-система предназначена для диагностики первичной текущей инфекции, вызванной вирусом кори, и основана на выявлении вирусоспецифических иммуноглобулинов G с низкой авидностью, образующихся в начале

иммунного ответа при размножении вируса в организме и сохраняющихся в течение 1-2 месяцев.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

ПРИНЦИП ТЕСТИРОВАНИЯ. На поверхности лунок планшета для иммунологических реакций адсорбированы антигены вируса кори. При инкубации в лунках планшета исследуемых образцов сывороток антитела, специфичные к белкам вируса кори, взаимодействуют с адсорбированными антигенами, образуя иммунные комплексы. После отмывки несвязавшихся антител часть лунок данного образца обрабатывают раствором №5, который способствует удалению «ранних» иммуноглобулинов G, отличающихся низкой авидностью. Внесенный конъюгат (антитела против иммуноглобулинов человека, меченные пероксидазой хрена) взаимодействует с вирусоспецифическим комплексом антиген-антитело. После отмывки связавшийся конъюгат выявляют с помощью раствора хромогена (тетраметилбензидина) в присутствии перекиси водорода, который приобретает окраску от светло-голубой до голубой. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антител к вирусу кори в образце.

При отсутствии в исследуемом образце антител к вирусу кори иммунные комплексы не образуются, и раствор хромогена не окрашивается. После остановки ферментативной реакции раствором серной кислоты измеряют оптическое поглощение окрашенного раствора в лунках планшета с помощью спектрофотометра при длине волны 450 нм. На присутствие в испытуемой сыворотке вирусоспецифических антител с низкой авидностью будет указывать существенное снижение интенсивности окрашивания в лунках после обработки раствором №5 по сравнению с необработанными лунками.

Перед проведением исследований необходимо внимательно изучить все разделы инструкции!

Для проведения анализа используйте сыворотку крови, взятой из вены или пальца, в количестве не менее 1,5 мл.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, следует осветлять центрифугированием. Сыворотку следует хранить при 2-10 °С не более 5 суток. При температуре минус 15 °С и ниже допускается хранить сыворотку до одного года. При этом не рекомендуется многократное оттаивание и замораживание образцов.

ВНИМАНИЕ! *Исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом может привести к получению ложных результатов.*

Каждый образец сыворотки или буферного раствора необходимо отбирать новым наконечником.

Недопустимо использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов!

Не следует проводить анализ образцов таким образом, чтобы на одного оператора одновременно приходилось более четырех планшетов.

Со всеми тестируемыми образцами, отработанными растворами, а также оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, следует обращаться как с потенциально зараженными объектами:

- все отработанные растворы обрабатывать 3 %-ным раствором хлорамина или 6 %-ным раствором перекиси водорода при комнатной температуре в течение 3 ч;

- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой, а затем подвергать автоклавированию;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-ным спиртом.

Для анализа дополнительно требуются следующие материалы и оборудование:

- дистиллированная или деионизованная вода;
- серная кислота квалификации "хч" или "осч";
- хлорамин или перекись водорода для обеззараживания;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;
- пипетки одноканальные автоматические для подачи жидкостей в объеме от 10 до 1000 мкл;
- пипетки 12-канальные (8-канальные) для подачи жидкости в объеме от 50 до 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые на 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые на 1000 мкл;
- центрифуга настольная на 7-10 тыс. об/мин;
- пробирки центрифужные полипропиленовые на 1,5-2,2 мл для хранения и осветления образцов сыворотки;
- мерные стаканы или цилиндры на 25-50 и 500 мл;
- ванночки для реагентов или стеклянные чашки Петри;
- воздушный термостат на 37 °С;
- аппарат для промывания планшетов (не обязательно);
- встряхиватель (вибратор) для планшетов (не обязательно);
- спектрофотометр для измерения оптического поглощения на 450 нм;
- контейнер для сброса зараженных твердых отходов;
- автоклав для инактивации зараженных отходов;
- контейнер для слива зараженных жидкостей;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага;
- полиэтиленовая пленка.

1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

Перед постановкой реакции все используемые растворы выдержите при комнатной температуре около 30 минут и тщательно взбалтывайте.

1.1 Раствор №1 - для отмыwania планшетов.

При выпадении в концентрате кристаллов прогрейте его перед разведением при температуре 35-37 °С до полного растворения. Интенсивно взболтайте содержимое флакона. Разведите 12 мл концентрата (25х) раствора №1 в 300 мл дистиллированной или деионизованной воды.

Хранить не более 3 суток при температуре 2-10 °С.

1.2. Раствор №2 - для приготовления разведений сывороток и конъюгата.

В 100 мл раствора №1 разведите содержимое ампулы (флакона) со стабилизатором, тщательно ополаскивая флакон или ампулу полученным раствором. Время растворения при перемешивании - не более 30 мин.

Хранить не более 24 ч при 2-10 °С.

1.3. Рабочий раствор хромогена (ТМБ).

Готовят перед использованием в защищенном от света месте.

Отберите 10 мл раствора для разведения хромогена, поместите в чистую емкость и добавьте 1 мл раствора ТМБ, тщательно перемешайте.

Хранить не более 10 минут при 4-25 °С в защищенном от света месте.

ВНИМАНИЕ! *Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором хромогена, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, т.к. даже их следы приводят к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе пероксидазной реакции. Избегайте также контакта раствора хромогена с металлами. Нельзя использовать раствор ТМБ, если он приобретает в процессе приготовления голубое окрашивание.*

При манипуляциях с реагентами, содержащими ТМБ, необходимо избегать их попадания на незащищенную кожу и слизистые оболочки; в случае контакта - промывать большим количеством воды.

1.4. Раствор конъюгата.

Из пробирки с конъюгатом отберите 0,3 мл, перенесите в чистую емкость и добавьте 12 мл раствора №2. Тщательно перемешайте.

Рабочий раствор конъюгата хранить не более 15 мин при 4-25 °С в защищенном от света месте.

1.5. Раствор серной кислоты (2,5 моль/л) для остановки пероксидазной реакции.

Хранение не ограничено.

2. ПОДГОТОВКА СЫВОРОТОК

2.1. Подготовка контрольных образцов (К+НАТ, К+ВАТ, К-).

Содержимое ампулы (флакона) с каждым контрольным образцом разведите раствором №2 в объеме, указанном на этикетке (рабочее разведение):

К+НАТ разведите в 1,0 мл раствора №2;

К+ВАТ разведите в 1,0 мл раствора №2;

К- разведите в 1,0 мл раствора №2.

Дополнительное разведение не требуется.

Время растворения - не более 15 мин.

Растворенные сыворотки храните при 2-10 °С не более 2 недель.

2.2. Подготовка испытуемых сывороток.

Испытуемые сыворотки разведите 1:100 раствором №2 во вспомогательных пробирках или на пластиковых панелях с лунками вместимостью 2 мл. Например, внесите во все вспомогательные пробирки/лунки по 0,5 мл раствора №2. Затем внесите по 5,0 мкл испытуемой цельной сыворотки, перемешивая пипетированием или с помощью вибратора.

Разведенные испытуемые сыворотки не храните!

3. ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

3.1. Планшеты освободите от упаковки и разместите на рабочем месте.

3.2. Порядок внесения исследуемых и контрольных образцов сывороток.

Каждый образец сыворотки следует вносить в четыре соседние лунки 2-х вертикальных рядов так, чтобы были заполнены две лунки с вирусным и две - с

контрольным антигеном, например, сыворотку №1 в лунки ряда 1 (А, В) и 2 (А, В); сыворотку №2 в лунки ряда 1(С, D) и 2(С, D) и т.д.

3.2.1. Внесение исследуемых образцов сывороток.

Перенесите по 0,10 мл каждого разведения испытуемой сыворотки (п.2.2) в четыре лунки двух вертикальных рядов рабочего планшета. Оставьте незаполненными 16 лунок для контролей.

3.2.2. Внесение контрольных образцов сывороток.

В четыре лунки 5(G,H) и 6(G,H) внесите по 0,1 мл рабочего разведения К+НАТ; в следующие четыре лунки 7(G,H) и 8(G,H), внесите по 0,1 мл рабочего разведения К+ВАТ и еще в четыре лунки 9(G,H) и 10(G,H), внесите по 0,1 мл рабочего разведения К-. В оставшиеся четыре лунки 11(G,H) и 12(G,H) вместо сывороток внесите по 0,1 мл раствора №2 для контроля конъюгата ("КК").

Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным и быстрым перемешиванием раствора в лунке с помощью наконечника автоматической пипетки или с помощью встряхивателя (вибратора).

Планшет заклейте пленкой или закройте чистой крышкой и инкубируйте в течение 2 часов при 37 °С.

3.3. Удалите раствор сывороток из лунок с помощью промывателя, затем планшет 5-кратно промойте раствором №1, внося в лунки не менее 0,2 мл раствора, выдерживая залитые планшеты не менее 15 секунд и полностью удаляя промывающий раствор. По окончании промывания тщательно удалите влагу из лунок, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

3.4. В четные ряды (ряды 2, 4, 6, 8, 10, 12) внесите по 0,2 мл на лунку раствор №5. Планшеты выдержите в течение 5 мин, периодически потряхивая. Затем раствор удалите и внесите свежий раствор №5 по 0,2 мл на лунку. После 5 минут инкубации раствор слейте.

3.5. Планшеты промойте как описано в п.3.3.

3.6. Во все лунки планшета внесите по 0,1 мл раствора конъюгата (п.1.4). Планшет закройте сухой крышкой или заклейте новым листом пленки и инкубируйте в течение 1 часа при 37 °С.

3.7. Удалите раствор конъюгата из лунок с помощью промывателя, затем планшет 5-кратно промойте раствором №1, как описано в п.3.3, после чего тщательно удалите влагу.

3.8. В каждую лунку планшета внесите по 0,1 мл раствора хромогена (субстратно-индикаторной смеси) (п.1.3). Планшет накройте крышкой и поместите в защищенное от света место на 20-25 мин при температуре 15-25 °С. *Не располагайте планшеты стопкой!*

3.9. Остановите пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл раствора серной кислоты в концентрации 2,5 моль/л (п.1.1.5) и немедленно проведите учет результатов.

4. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ИФА

Измерение оптической плотности (ОП) проводите при длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществляйте только по воздуху.

4.1. Проверка правильности проведения опыта.

Результаты измерения оптической плотности (ОП) для контрольных образцов должны удовлетворять следующим требованиям:

среднее значение ОПкк по четырем лункам (с АгКорь и КАг) должно быть не выше 0,2, как в обработанных, так и в необработанных раствором №5 лунках;
 при исследовании К+ВАТ индекс avidности должен быть не ниже 50 %;
 при исследовании К+НАТ индекс avidности не должен превышать 30 %;
 при исследовании К- разность (ОПАгКОРЬ– ОПКАг) должна быть не выше 0,2.

В случае соблюдения всех этих условий можно приступить к учету результатов анализа исследуемых образцов. В противном случае реакцию необходимо переставить.

4.2. Учет результатов исследований.

Учет результатов проводят, сравнивая разность оптической плотности в реакции исследуемой сыворотки с вирусными и контрольным антигенами (^ОП) в соответствующих лунках, обработанных и не обработанных раствором №5. Если в лунках, не обработанных раствором №5 ^ОП превышает 0,2, то сыворотку расценивают как положительную, содержащую антитела к вирусу кори.

Aвидность антител в контрольных и испытуемых сыворотках оценивают только тогда, когда сыворотки, не обработанные раствором №5, имеют показатели ^ОП не менее 0,6. Aвидность антител выражают в индексах avidности (ИА).

ИА антител в К+НАТ, К+ВАТ и испытуемых сывороток рассчитывают по следующей формуле и выражают в процентах:

$$\frac{\text{ОП (разность ОП в лунках с вирусным и контрольным антигенами) после обработки раствором №5}}{\text{ОП в лунках с той же сывороткой, не обработанных раствором №5}} \times 100$$

Выявление в испытуемой сыворотке антител с индексом avidности равным или ниже 30 % указывает на свежую первичную инфекцию обследованного пациента.

Выявленный показатель avidности выше 40 % указывает на то, что в сыворотке содержатся анамнестические, высокоavidные антитела, свидетельствующие об инфекции в прошлом.

Показатель avidности антител в интервале 31-39 % может свидетельствовать о поздней стадии первичной инфекции (стадии реконвалесценции) только при условии выявления антител в высокой концентрации: ^ОП больше 1,5 в лунках, не обработанных раствором №5.

Если после обработки лунок раствором №5 ^ОП снижается ниже пороговой величины, равной 0,2, то в числителе вышеприведенной формулы указывают величину 0,2:

$$\frac{0,2}{\text{ОП в лунках с той же сывороткой, не обработанных раствором №5}} \times 100$$

Если при исследовании сыворотки показатель оптической плотности с вирусным антигеном превышает 2,0 («зашкаливает»), то такую сыворотку тестируют в более высоком разведении.

Пациенты, в сыворотках которых до обработки раствором №5 выявилась ^ОП меньше 0,6, а после обработки обнаруживалась тенденция снижения активности антител, подлежат дальнейшему обследованию в динамике заболевания через 7-14 дней.

Окончательный диагноз ставят на основании анализа данных клинических, серологических и эпидемиологических исследований.

ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-система выпускается в виде набора реагентов, упакованных в коробку:

№	Наименование компонентов	Кол-во
1.	Иммуносорбент	2 шт.
2.	К+НАТ - по 0,2 мл (сухой) во флаконе	1 шт.
3.	К+ВАТ - по 0,2 мл (сухой) во флаконе	1 шт.
4.	К- - по 0,2 мл (сухой) во флаконе	1 шт.
5.	Конъюгат - 0,8 мл (жидкий) в пластиковой пробирке на 1,5 мл	1 шт.
6.	Раствор для разведения хромогена (БСГ) - по 15 мл во флаконе	2 шт.
7.	Хромоген (ТМБ) - по 2,5 мл во флаконе	1 шт.
8.	Стабилизатор- по 1,0 мл во флаконе	1 шт.
9.	Концентрат р-ра №1 для промывания планшетов - по 26 мл во флаконе	2 шт.
10.	Раствор №5 для обработки сывороток - по 25 мл во флаконе	2 шт.
11.	Стоп-раствор - по 15 мл во флаконе	1 шт.
12.	Планшет для предварительного разведения сывороток	1 шт.
13.	Ванночка для реагентов	2 шт.
14.	Плётка для заклеивания планшета	2 шт.

Количество флаконов (ампул) с конъюгатом может быть увеличено в зависимости от его титра.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Наборы хранят и транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре 2-10 °С в условиях, исключающих замораживание.

Срок годности - 12 месяцев со дня выпуска.

За справками обращаться в Биотехнологическую компанию "Биосервис" по телефону (495) 674 5605.

ДЛЯ ЗАМЕТОК