

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления антител класса G к вирусу кори в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа "БиоСкрин-Корь"

Е-0845 **БиоСкрин-Корь**

Настоящая инструкция распространяется на набор реагентов иммуноферментный "Корь-скрин" для выявления антител класса 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 сорбирован антиген вируса кори (АгВК - в рядах планшета А, С, Е, G) и контрольный антиген (кАг - в рядах В, D, F, H). АгВК представляют собой инфицированные вирусом кори клетки Vero, содержащие не менее 80 % вирусосодержащих клеток. кАг представляет собой незараженные клетки Vero;

2) положительный контрольный образец (К+) - сыворотка крови человека, содержащая антитела к вирусу кори - инактивированная прогреванием при температуре 56 °С в течение 30 минут;

3) отрицательный контрольный образец (К-) - сыворотка крови человека или сывороточный альбумин человека, не содержащие антител к вирусу кори - инактивированные прогреванием при температуре 56 °С в течение 30 минут;

К+, К-:

опалесцирующие прозрачные жидкости: К+ - розового цвета, К- - синего цвета.

4) конъюгат - антитела диагностические против иммуноглобулинов класса G человека, меченные пероксидазой хрена:

прозрачная жидкость;

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

прозрачная жидкость (готовая к употреблению);

6) хромоген (тетраметилбензидин-ТМБ):

прозрачная жидкость;

7) стабилизатор (СТ):

казеин - непрозрачная жидкость белого или желтоватого цвета;

8) Концентрат (25x) раствора №1 для отмывания планшетов и приготовления разведений сывороток и конъюгата (концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т):

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

9) Стоп-раствор-прозрачная жидкость (готовая к употреблению).

Тест-система рассчитана на проведение 96 анализов, включая контрольные.

НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментная тест-система предназначена для выявления антител к вирусу кори в сыворотке или плазме крови человека.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

ПРИНЦИП ТЕСТИРОВАНИЯ. На поверхности лунок планшета для иммунологических реакций иммобилизованы 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 в лунки добавляют конъюгат (антитела против иммуноглобулинов человека, меченные пероксидазой хрена), который 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-голубого до голубого. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антител к вирусу кори человека в образце. При отсутствии в исследуемом образце антител к вирусу кори человека 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.

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°C не более 10 суток. При температуре минус 20°C 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 % раствором хлорамина или 6 % 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 % 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 отмывания 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 (БСА или казеин), 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 БСГ (раствор №6), поместите в чистую емкость и добавьте 1 мл раствора ТМБ, тщательно перемешайте.

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

1.4. Раствор конъюгата.

Из пробирки с конъюгатом отберите 0,6 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+, К-) (в наборе с жидкими контрольными образцами).

Из пробирки с каждым контрольным образцом отберите 0,05 мл, перенесите в чистую пробирку и добавьте 0,45 мл раствора №2 (рабочее разведение):

Перемешайте пипетированием. Последующее разведение не требуется.
Рабочее разведение сыворотки храните при 2-10 °С не более 24 часов.

2.2. Подготовка испытуемых сывороток.

В зависимости от целей исследования испытуемые образцы готовят по-разному.

2.2.1. Подготовка сывороток при проведении сероземиологических исследований.

При проведении сероземиологических исследований по определению иммунного статуса или по оценке эффективности вакцинации против кори, 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 панели) по 0,5 мл р-ра №2, а затем - по 5 мкл цельной сыворотки, перемешивая пипетированием или с помощью вибратора.

2.2.2. Подготовка сывороток при проведении диагностических исследований.

При проведении диагностических исследований (для лабораторного подтверждения диагноза кори) заранее приготовьте парные сыворотки, полученные с интервалом от 7 до 14 суток, причем первую - не позднее пятых суток момента появления сыпи. Тестируйте оба образца на одном планшете. Тщательно соблюдайте условия хранения образцов сывороток! Каждый образец сыворотки титруйте с двукратным шагом от 1:100 до 1:3200.

Для этого приготовьте шесть последовательных разведений каждого образца сыворотки во вспомогательных пробирках (лунках планшета объемом 2 мл).

Например, в первую пробирку/лунку внесите 1 мл раствора №2, а в следующие 5 пробирок - по 0,5 мл раствора №2. Затем добавьте в первую пробирку/лунку 10 мкл цельной сыворотки (получая разведение 1:100) и тщательно перемешайте пипетированием. После этого отберите из полученного раствора 0,5 мл и перенесите во вторую пробирку/лунку, тщательно перемешайте, снова отберите 0,5 мл уже из 2-ой и перенесите в третью. Процедуру повторите, пока не дойдете до 6-ой пробирки/лунки.

Аналогичным образом подготовьте второй образец сыворотки того же пациента, полученной при повторном взятии крови.

Если парные сыворотки исследуются повторно (см.п.4.3. раздела «Учет результатов»), исследуйте их в другом интервале разведений от 1:1000 до 1:32000.

Для этого вначале приготовьте предварительное разведение сыворотки 1:100 - в пробирку/лунку внесите 1,0 мл раствора №2 и 10 мкл цельной сыворотки.

Приготовьте шесть вспомогательных пробирок/лунок. В первую из шести внесите 0,9 мл раствора №2, в остальные - по 0,5 мл раствора №2. Затем добавьте в первую пробирку/лунку 0,1 мл предварительно разведенной 1:100 исследуемой сыворотки (получая разведение 1:1000) и тщательно перемешайте пипетированием. После этого отберите из полученного раствора 0,5 мл и перенесите во вторую пробирку/лунку, тщательно перемешайте, снова отберите

0,5 мл уже из 2-ой пробирки/лунки и перенесите в третью. Процедуру повторите, пока не дойдете до 6-ой пробирки/лунки.

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.

3.2.1. Внесение исследуемых образцов сывороток.

Перенесите по 0,1 мл каждой испытуемой сыворотки или каждого ее разведения (п.2.2) в две лунки вертикального ряда рабочего планшета с вирусными и контрольными антигенами, как показано на рис.1. Оставьте незаполненными 6 лунок для контролей.

3.2.2. Внесение контрольных образцов сывороток.

В две лунки 10(G,H) внесите по 0,1 мл рабочего разведения K+ (п.2.1); в две лунки 11(G,H) внесите по 0,1 мл рабочего разведения K- (п.2.1); в две лунки 12(G,H) вместо сывороток внесите по 0,1 мл раствора №2 (контроль конъюгата, "КК").

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	№1	№2											AgBK
B	№1	№2											KAг
C													AgBK
D													KAг
E													AgBK
F													KAг
G										K+	K-	KK	AgBK
H										K+	K-	KK	KAг

Рис.1. Расположение лунок с сорбированными антигенами вируса кори (AgBK) и контрольным антигеном (KAг) на рабочем планшете и схема внесения исследуемых и контрольных образцов сывороток.

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 1 часа при 37 °С.

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

3.4. 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.

3.5. Удалите раствор конъюгата из лунок с помощью промывателя, затем планшет промойте раствором №1, как описано в п.3.3.

3.6. В каждую лунку планшета внесите по 0,1 мл раствора хромогена (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!

3.7. Остановите пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-раствора 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 ОП_{кк} по двум лункам (с АгВК и кАг) должно быть менее 0,250 о.е.;

при исследовании К+ разность (ОПАгВК – ОПкАг) должна быть не менее 0,500 о.е.;

при исследовании К- разность (ОПАгВК – ОПкАг) должна быть менее 0,250 о.е.

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

4.2. Учет результатов при сероэпидемиологических исследованиях.

Для каждой сыворотки вычислите разность (ОПАгВК - ОПкАг). Если разность (ОПАгВК - ОПкАг) больше 0,250 о.е., то сыворотка расценивается как положительная, т.е. содержащая антитела к вирусу кори.

Если разность (ОПАгВК - ОПкАг) меньше или равна 0,250 о.е., то сыворотка расценивается как отрицательная, т.е. не содержащая антител к вирусу кори.

Высокое значение ОП, превышающее 0,600 о.е. при взаимодействии сыворотки с контрольным антигеном, свидетельствует о неудовлетворительном ее состоянии (длительное хранение, бактериальное загрязнение, наличие консервантов и т.п.), интерпретация результатов исследования таких сывороток затруднена, поэтому целесообразно тестировать повторно полученный образец.

4.3. Учет результатов при диагностических исследованиях.

Оценку результатов диагностических исследований проводят на основании сравнения титров парных сывороток от одного пациента, определенных в одном опыте (на одном рабочем планшете). Если у пациента произошла сероконверсия или в сыворотке, полученной на более позднем

сроке, титр антител достоверно повышается (более чем в 4 раза), это свидетельствует о свежем случае заболевания.

Следует учесть, что отсутствие сероконверсии или повышения титров антител может быть вызвано неверно выбранным интервалом взятия крови. Поэтому если в парных сыворотках определены сходные высокие титры антител к вирусу кори, то для подтверждения острой инфекции такие сыворотки необходимо исследовать на содержание антител класса М, либо на содержание низкоавидных антител класса G к вирусу кори.

Для всех разведений каждого образца сыворотки вычислите разность (ОПАгВК - ОПкАг). Наивысшее разведение сыворотки, при которой разность (ОПАгВК - ОПкАг) еще превышает 0,250 о.е., принимают за титр антител в данной сыворотке.

Определите титр каждого образца сыворотки.

Сравните между собой титры парных сывороток. Для этого найдите величину отношения T2 к T1, где

T1 - титр сыворотки, полученной при первом заборе крови;

T2 - титр сыворотки, полученной при втором заборе крови.

Результат исследования считается отрицательным, т.е. у пациента отсутствует острая коревая инфекция, если:

а) отношение T2/T1 меньше 4,0;

б) в паре сывороток во всех разведениях разность (ОПАгВК - ОПкАг) меньше 0,250 о.е.

Результат исследования считается положительным, т.е. имеет место острая коревая инфекция, если:

а) отношение T2/T1 больше или равно 4,0;

б) выявлена сероконверсия (отсутствие антител в первой сыворотке и наличие антител во второй сыворотке).

В случае если хотя бы одна из пары сывороток оказалась недотитрованной, проведите их повторное исследование при более высоких разведениях (например, от 1:1000 до 1:32000).

Установите титры сывороток и вычислите отношение T2/T1.

Если отношение T2/T1 больше или равно 4,0, то результат повторного уточняющего исследования является положительным, т.е. имеет место острая коревая инфекция.

Если отношение T2/T1 меньше 4,0, то коревая инфекция отсутствует. Однако если были нарушены сроки забора парных сывороток (см. раздел «Способ применения»), то для исключения диагноза "корь" данные парные сыворотки необходимо исследовать в других тест-системах на содержание антител класса М к вирусу кори, либо на содержание низкоавидных антител класса G к вирусу кори.

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

ФОРМА ВЫПУСКА

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

Наименование компонентов	Количество
1. Иммуносорбент в металлизированном пакете	2 шт.
2. К+ - по 0,2 мл (жидкая) во флаконе	1 шт.
3. К- - по 0,2 мл (жидкая) во флаконе	1 шт.
4. Конъюгат - 0,9 мл (жидкий) в пластиковой пробирке на 2	1 шт.
5. Буферная смесь с гидроперитом (БСГ) - по 26 мл во флакон	1 шт.
6. Хромоген (ТМБ) - по 2,5мл во флаконе	1 шт.
7. Стабилизатор - по 1,0 мл во флаконе	1 шт.
8. Концентрат р-ра №1 - по 26 мл во флаконе	2 шт.
9. Стоп-раствор- по 15 мл во флаконе	1 шт.

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.

Рекламации на качество наборов необходимо направлять в ГИСК им. Л.А. Тарасевича по адресу: 121002, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. 241-3922, 952-4098. За справками обращаться в ЗАО БТК «Биосервис» (предприятие-изготовитель) по телефону (495) 674 5605.