

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления низкоавидных
иммуноглобулинов класса G к
вирусу краснухи
«Краснуха-диагност»

ФСР 2009/06481

E-0763 Краснуха-диагност

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Краснуха-диагност» предназначен для выявления низкоавидных IgG-антител к вирусу краснухи в сыворотке/плазме крови человека методом иммуноферментного анализа с целью диагностики первичной инфекции. Наличие низкоавидных антител является индикатором первичной инфекции в предшествующие 2-3 месяца.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Для определения индекса авидности антител IgG каждый образец сыворотки или плазмы крови человека исследуют методом иммуноферментного анализа в двух параллельных лунках планшетов с иммобилизованным вирусом краснухи. При этом антитела, специфичные к белкам вируса краснухи, взаимодействуют с адсорбированным вирусом, образуя иммунные комплексы. После однократной отмывки несвязавшихся антител в контрольные лунки (К-лунки), - вносят фосфатный буфер, в опытные (ДР-лунки) - денатурирующий раствор, который вызывает диссоциацию комплексов низкоавидных антител с антигеном. Степень диссоциации зависит от авидности антител в исследуемом образце. После отмывки в лунки добавляют конъюгат - мышинные моноклональные антитела к Fc-фрагменту IgG человека, меченные пероксидазой хрена, - который взаимодействует с комплексом антиген-антитело. Отмыв несвязавшуюся часть конъюгата, в лунки планшета вносят индикаторный раствор, включающий субстрат и хромоген. Содержащийся в конъюгате фермент катализирует разложение субстрата, что приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию антител IgG к вирусу краснухи в исследуемом образце. По окончании исследования измеряют оптическое поглощение растворов в лунках при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм). На присутствие в исследуемом образце низкоавидных антител указывает снижение оптического поглощения в лунке, обработанной денатурирующим раствором, в сравнении с контрольной лункой.

2.2. Состав набора

Набор выпускается в виде реагентов, упакованных в коробку:

Компонент набора	Описание	Количество
Иммуносорбент	Вирус краснухи, адсорбированный в лунках разборного 96-луночного планшета с прозрачным плоским дном лунок.	1 шт.
Высокоавидный положительный контрольный образец инактивированный, K ⁺ ВАТ	Сыворотка крови человека, содержащая высокоавидные IgG-антитела к вирусу краснухи, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антиген р24 ВИЧ-1, HBsAg. Инактивирована прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в	1,5 мл 1 пробирка

	<p>течение 3 ч. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.</p>	
<p>Низкоавидный положительный контрольный образец инаktivированный, K⁺_{НАТ}</p>	<p>Сыворотка крови человека, содержащая низкоавидные IgG- антитела к вирусу краснухи, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антиген р24 ВИЧ-1, HBsAg. Инаktivирована прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.</p>	<p>1,5 мл 1 пробирка</p>
<p>Отрицательный контрольный образец инаktivированный, K⁻</p>	<p>Сыворотка крови человека, не содержащая IgG-антитела к вирусу краснухи, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антиген р24 ВИЧ-1, HBsAg. Инаktivирована прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета.</p>	<p>1,5 мл 1 пробирка</p>
<p>Конъюгат</p>	<p>Моноклональные антитела мыши против IgG человека, связанные с ферментом пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.</p>	<p>15 мл 1 флакон</p>
<p>Концентрат раствора № 1 для промывания планшетов (×25)</p>	<p>25-кратный концентрат фосфатного буфера с детергентом. Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре 35-37°С в течение 30 мин.</p>	<p>25 мл 2 флакона</p>
<p>Раствор № 2 для разведения сывороток</p>	<p>Прозрачная или опалесцирующая пенящаяся жидкость синего цвета, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.</p>	<p>25 мл 1 флакон</p>

Денатурирующий раствор	Раствор мочевины. Прозрачная бесцветная жидкость, при хранении возможно выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре (35-37) °С в течение 30 мин.	8 мл 1 пробирка
Фосфатный буфер	Прозрачная бесцветная жидкость.	8 мл 1 пробирка
Раствор № 4 для разведения хромогена (БСГ)	Буферная смесь с перекисью водорода. Прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл 1 флакон
Хромоген	Раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Прозрачная бесцветная жидкость.	1,5 мл 1 пробирка
Стоп-реагент	1М раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость.	8 мл 1 пробирка

Набор рассчитан на проведение 48 анализов, включая контрольные.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

- не пипетировать растворы ртом, при работе использовать индивидуальные средства защиты (резиновые перчатки и защитные очки);

- все отработанные растворы и отходы после завершения анализа обрабатывать в соответствии с установленными нормами безопасности (например, в течение 16-18 часов в растворе гипохлорита натрия в конечной концентрации 1 %);

- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем автоклавировать в течение 60 мин при 121 °С или сжигать;

- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-м раствором этилового спирта;

- утилизировать отходы, в соответствии с требованиями СП 1.3.2322 - 08 (Санитарно - эпидемиологические правила "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней"), соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения анализа необходимо использовать:

- дистиллированную или деионизованную воду;
- дезинфицирующие растворы, соответствующие санитарным требованиям;
- резиновые перчатки;
- раствор спирта этилового 70 %;
- пипетки одноканальные автоматические вместимостью от 5 мкл до 1000 мкл;
- пипетки 8- или 12-канальные вместимостью от 50 мкл до 250 мкл;

- наконечники полипропиленовые вместимостью 250 мкл;
 - наконечники полипропиленовые вместимостью 1000 мкл;
 - центрифугу настольную на $(3-10) \times 10^3$ об/мин;
 - пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью 1,5-2,2 мл для хранения и осветления образцов сыворотки;
 - пробирки полипропиленовые вместимостью 1,0-2,0 мл или вспомогательный планшет для предварительного разведения образцов сыворотки;
 - мерные стаканы или цилиндры вместимостью 250 мл и 500 мл;
 - воздушный термостат на 37°C;
 - спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при длине волны 450 нм (длине волны сравнения - 620-650 нм);
 - контейнер для сбора твердых отходов;
 - автоклав для дезинфекционной обработки расходных материалов после проведения исследования;
 - контейнер для слива отработанных жидкостей;
 - фильтровальную бумагу;
 - пленку полиэтиленовую;
- Рекомендуется использовать аппарат для автоматического промывания планшетов и встряхиватель для перемешивания содержимого флаконов и пробирок.

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исключения ложных результатов подготовку исследуемых образцов осуществлять в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, осветлять центрифугированием. Собранные образцы сывороток или плазмы крови хранить при температуре от 4°C до 6 °С. Если образцы невозможно протестировать в течение 72 ч, то хранить их при температуре не выше минус 15°C. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Помните, что исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, может привести к получению ложных результатов.

5.1. Подготовка испытуемых образцов сывороток

Испытуемые образцы сывороток развести в 100 раз раствором № 2 во вспомогательных одноразовых пробирках вместимостью 1-2 мл. Например, внести во все вспомогательные пробирки по 0,5 мл раствора № 2, а затем по 5 мкл образца цельной сыворотки, перемешать с помощью встряхивателя или пипетированием.

Разведенные испытуемые образцы сывороток не хранить!

Каждый образец сыворотки или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

ВНИМАНИЕ! Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов! Анализ проб следует проводить так, чтобы на одного оператора одновременно приходилось не более одного набора.

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1. Приготовление реагентов (для проведения 8 анализов)

Условия и сроки хранения вскрытых компонентов набора приведены в Таблице № 1.

Таблица № 1. Условия и сроки хранения компонентов.

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	от 2 °С до 8 °С в плотно закрытом пакете	8 недель
K ⁺ , K ⁻ , конъюгат, концентрат (25x) раствора № 1, раствор № 2, Р-р №4, ТМБ	от 2 °С до 8 °С	8 недель
Стоп-реагент	от 2 °С до 8 °С	до окончания срока годности набора

Перед началом работы набор выдержать при комнатной температуре 30 минут.

Раствор № 2, денатурирующий раствор, фосфатный буфер, стоп-реагент, конъюгат, K⁺_{ВАТ}, K⁺_{НАТ} и K⁻ готовы к применению.

В растворе № 2, возможно выпадение рыхлого комкующегося осадка, перед использованием содержимое флакона с раствором № 2 необходимо интенсивно встряхнуть до исчезновения осадка.

Содержимое флакона с денатурирующим раствором интенсивно встряхнуть, а при выпадении осадка выдержать при температуре от 35 до 37 °С в течение 30 мин до полного растворения.

K⁺_{ВАТ}, K⁺_{НАТ} и K⁻ перед использованием обязательно перемешать.

6.1.1. Приготовление рабочего раствора № 1 для промывания планшетов

Содержимое флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхнуть. При выпадении в концентрате кристаллов прогреть его при температуре от 35 °С до 37 °С до полного растворения. 4 мл концентрата раствора № 1 перенести в мерную емкость, довести объем до метки 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать.

Готовый раствор хранить не более 24 ч при температуре от 4 °С до 12 °С или 4 часа при температуре от 18 °С до 24 °С.

6.1.2. Приготовление индикаторного раствора

За 5-10 мин до окончания реакции с конъюгатом приготовить рабочее разведение хромогена. Отобрать 2 мл раствора № 4, поместить в чистую емкость и добавить 0,2 мл хромогена в расчете на 2 стрипа. Тщательно перемешать.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с хромогеном, раствором № 4 и индикаторным раствором, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе пероксидазной реакции. Избегать также контакта этих реагентов с металлами.

6.2. Проведение реакции

6.2.1. Иммуносорбент освободить от упаковки, в каретке оставить четное количество стрипов, необходимое для проведения анализа. Остальные стрипы поместить обратно в пакет и хранить в соответствии с условиями, указанными в таблице № 1.

6.2.2. Внесение испытуемых и контрольных образцов сывороток

Все образцы исследовать в двух параллельных лунках: К-лунке и ДР-лунке.

Внести по 100 мкл K^- , $K^+_{\text{БАТ}}$, $K^+_{\text{НАТ}}$, в две соседние лунки 2-х вертикальных рядов планшета в соответствии со схемой, представленной на рис.1.

Внести по 100 мкл предварительно подготовленных (п. 5.1.) испытуемых образцов сывороток в каждые две соседние лунки 2-х вертикальных рядов планшета в соответствии со схемой, представленной на рис.1.

Рис.1. Схема внесения контрольных и испытуемых образцов сывороток.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K^-	K^-	№6	№6	№14	№14	№22	№22	№30	№30	№38	№38
B	$K^+_{\text{БАТ}}$	$K^+_{\text{БАТ}}$	№7	№7	№15	№15	№23	№23	№31	№31	№39	№39
C	$K^+_{\text{НАТ}}$	$K^+_{\text{НАТ}}$	№8	№8	№16	№16	№24	№24	№32	№32	№40	№40
D	№1	№1	№9	№9	№17	№17	№25	№25	№33	№33	№41	№41
E	№2	№2	№10	№10	№18	№18	№26	№26	№34	№34	№42	№42
F	№3	№3	№11	№11	№19	№19	№27	№27	№35	№35	№43	№43
G	№4	№4	№12	№12	№20	№20	№28	№28	№36	№36	№44	№44
H	№5	№5	№13	№13	№21	№21	№29	№29	№37	№37	№45	№45
	К- лунки	ДР - лунки	К - лунки	ДР - лунки	К - лунки	ДР - лунки	К - лунки	ДР - лунки	К - лунки	ДР - лунки	К- лунки	ДР - лунки

Планшет заклеить пленкой (или закрыть крышкой) и выдержать в течение 60 ± 2 мин при температуре 37 ± 1 °С.

6.2.3. Промывание

Удалить жидкость из лунок автоматическим или ручным промывателем.

Планшет однократно промыть раствором № 1 (см. п. 6.1.1.), внося в лунки по 250 мкл промывающего раствора и выдерживая раствор в лунках не менее 20 с. После промывания тщательно удалить остатки влаги из планшета, постукивая планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

ВНИМАНИЕ! Недостаточное промывание планшетов может привести к получению ложных результатов!

6.2.4. Во все К-лунки (ряды планшета №№ 1, 3, 5, 7, 9, 11) внести по 150 мкл фосфатного буфера, во все ДР-лунки (ряды планшета №№ 2, 4, 6, 8, 10, 12) - по 150 мкл денатурирующего раствора. Выдержать в течение 10 мин при температуре от 18 °С до 25 °С.

6.2.5. Повторить пятикратно процедуры промывания, описанные в п. 6.2.3.

6.2.6. Во все лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата. Планшет заклеить пленкой (или закрыть крышкой) и выдержать в течение 30±2 мин при температуре 37±1 °С.

6.2.7. Повторить пятикратно процедуры промывания, описанные в п. 6.2.3.

6.2.8. Во все лунки планшета внести 100 мкл индикаторного раствора (п. 6.1.2.). Планшет поместить в защищенное от света место на 15±2 мин при температуре 18-25 °С.

Не располагать планшеты стопкой!

6.2.9. Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и немедленно провести учет результатов.

7. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение оптической плотности (ОП) провести при длине волны 450 нм. Рекомендуемая длина волны сравнения 620-650 нм. Вывести спектрофотометр на нулевой уровень («бланк») по воздуху.

7.1. Результаты измерения, полученные при анализе контрольных образцов, должны удовлетворять следующим требованиям:

ОП в К-лунке с К ⁻	- не более 0,15 о.е.;
ОП в К-лунке с К ⁺ _{ВАТ}	- не менее 0,80 о.е.;
ОП в К-лунке с К ⁺ _{НАТ}	- не менее 0,80 о.е.

В том случае, если ОП испытуемого образца в контрольной лунке выше 1,9 о.е., провести повторное исследование образца крови в более высоком разведении.

В случае, если ОП испытуемого образца в К-лунке ниже 0,5 о.е., провести исследование образца крови, повторно взятого у пациента через 7-10 суток.

Вычислить индекс авидности (ИА) для контрольных образцов К⁺_{ВАТ} и К⁺_{НАТ} и испытуемых сывороток по формуле:

$$ИА = (ОП_{ДР-лунка} / ОП_{К-лунка}) \times 100 \%$$

где: ОП_{ДР-лунка} - ОП образца, обработанного денатурирующим раствором
 ОП_{К-лунка} - ОП образца в К-лунке

ИА К⁺_{ВАТ} должен быть не менее 60 %

ИА К⁺_{НАТ} должен быть не более 40 %

При получении иных показателей исследование повторить.

7.2. Вычислить ИА для исследуемых образцов по приведенной формуле (п. 7.1.).

По значению индекса авидности определить присутствие в испытуемом образце низкоавидных антител:

ИА ≤ 40 % указывает на наличие антител с низкой авидностью;
ИА от 40 % до 60 % свидетельствует о выявлении антител с неопределенной авидностью (пограничный результат);
ИА ≥ 60 % указывает на наличие антител с высокой авидностью.

Наличие высокоавидных антител не исключает возможность недавней инфекции.

Наличие низкоавидных антител является индикатором первичной инфекции в предшествующие 2-3 месяца.

В случае неопределенного результата рекомендуется не ранее, чем через 7 сут. повторно взять кровь и провести исследование второго образца одновременно с первым.

Примечание: для установления диагноза следует учитывать как данные результатов лабораторных исследований, так и всю сумму клинических проявлений и эпидемиологического анамнеза.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор транспортировать и хранить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2°C до 8°C. Не допускать замораживания. Допускается транспортирование в течение 3 суток при температуре от 9°C до 30°C.

Условия отпуска: для диагностики *in vitro* в лечебно-профилактических и санитарно-противоэпидемиологических учреждениях.

Срок годности набора 12 месяцев. Запрещается применять набор и его компоненты после окончания срока годности набора.