

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления IgG-антител к
вирусу краснухи
«БиоСкрин-Краснуха-IgG»

РЗН 2013/674

Е-0745 БиоСкрин-Краснуха-IgG

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «БиоСкрин-Краснуха-IgG» предназначен для выявления IgG-антител к вирусу краснухи в сыворотке/плазме крови человека методом иммуноферментного анализа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

На поверхности лунок планшета для иммунологических реакций адсорбированы антигены вируса краснухи.

Положительный контрольный образец инактивированный K⁺ представляет собой сыворотку крови человека, содержащую IgG-антитела к вирусу краснухи, в концентрации 23-35МЕ/мл (концентрация определяется в соответствии с 1-м международным стандартом ВОЗ RUBI-1-94), не содержащую антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1, HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Отрицательный контрольный образец инактивированный K⁻ представляет собой сыворотку крови человека, не содержащую IgG-антител к вирусу краснухи, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1, HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Конъюгат представляет собой моноклональные антитела мыши к Fc-фрагменту IgG человека, связанные с ферментом пероксидазой хрена.

Раствор № 4 для разведения хромогена содержит субстрат ферментативной реакции.

Хромогеном является 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

При внесении в лунки планшета исследуемых образцов сывороток антитела, специфичные к белкам вируса краснухи, взаимодействуют с адсорбированными антигенами, образуя иммунные комплексы. После отмывки не связавшихся антител в лунки добавляют конъюгат - антитела (мышинные моноклональные) к Fc-фрагменту IgG человека, меченные пероксидазой хрена, - который взаимодействует с комплексом антиген-антитело. После отмывки несвязавшейся части конъюгата в лунки планшета добавляют раствор гидроперита и хромоген. После остановки реакции стоп-реагентом интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют по оптическому поглощению при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм) на спектрофотометре. Его величина зависит от концентрации IgG антител к вирусу краснухи в образце сыворотки или плазмы крови человека.

Для проведения анализа используются образцы (сыворотка или плазма крови человека) в объеме не менее 5 мкл.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Набор выпускается в виде реагентов, упакованных в коробку:

Компонент	Описание	Количество
Иммуносорбент	Разборный 96-луночный планшет для иммунологических реакций с прозрачным плоским дном лунок.	1 шт.
Положительный контрольный образец инаktivированный K ⁺	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.	1,5 мл 1 пробирка
Отрицательный контрольный образец инаktivированный K ⁻	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета.	1,5 мл 1 пробирка
Конъюгат	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.	15 мл 1 флакон
Концентрат раствора № 1 для промывания планшетов (×25)	Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре (35-37) °С в течение 30 мин.	25 мл 2 флакона
Раствор № 2 для разведения сывороток	Прозрачная или опалесцирующая пенящаяся жидкость синего цвета, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	26 мл 1 флакон
Раствор № 4 для разведения хромогена	Прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл 1 флакон
Хромоген	Прозрачная бесцветная жидкость.	1,5 мл 1 пробирка
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость.	8 мл 1 флакон
Планшет для предварительного разведения образцов	Цельный или разборный 96-луночный планшет с прозрачным плоским дном лунок.	1 шт.
Ванночка для разведения реагентов	Ванночка из поливинилхлорида для 8-ми канального дозатора.	2 шт.
Пленка для заклеивания планшета	Самоклеющаяся влагонепроницаемая пленка	2 шт.

Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

Чувствительность набора составляет не более 5 МЕ/мл. Концентрация иммуноглобулинов G к вирусу краснухи в контрольном положительном образце K⁺ в пределах 23-25 МЕ/мл. Коэффициент вариации составляет не более 8 %. Тест на «открытие» в пределах 90-110 %. Тест на «линейность» в диапазоне концентраций 1-100 МЕ/мл допустим в пределах 80-120 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

- не пипетируйте растворы ртом, при работе используйте 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 сбрасывайте в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергайте автоклавированию в течение 60 мин при 121 °C или сжигайте;
- инструменты и оборудование до и после работы протирайте 70 %-м спиртом;
- утилизируйте отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.

Для проведения анализа необходимо использовать:

- дистиллированную или деионизованную воду;
- хлорамин или перекись водорода для обеззараживания;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;
- пипетки одноканальные автоматические для подачи жидкостей вместимостью от 5 мкл до 1000 мкл;
- пипетки 8- или 12-канальные для подачи жидкости 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 и 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;

- контейнер для сброса твердых отходов;
- автоклав для инактивации отходов;
- контейнер для слива отработанных жидкостей;
- вату гигроскопическую;
- фильтровальную бумагу;
- пленку полиэтиленовую;

Рекомендуется использование аппарата для промывания планшетов и встряхивателя для перемешивания.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исключения ложных результатов готовьте и храните исследуемые образцы в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, осветляйте центрифугированием. Собранные образцы сывороток или плазмы храните при температуре от 4 °С до 6 °С. Если образцы невозможно протестировать в течение 72 ч, то храните их при температуре не выше минус 15 С. 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.

В предлагаемой тест-системе могут быть исследованы образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.1. Подготовка испытуемых образцов сывороток.

Испытуемые сыворотки разведите в 10 раз раствором для разведения сывороток в планшете для предварительного разведения, перемешайте пипетированием или с помощью встряхивателя.

Разведенные испытуемые образцы сывороток не храните!

Каждый образец сыворотки 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.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ (для проведения 8 анализов)

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

Таблица № 1.

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	от 2 до 8° С в плотно закрытом пакете	8 недель
K ⁺ , K ⁻ , конъюгат, концентрат раствора № 1, растворы № 2, № 4, хромоген	от 2 до 8° С	8 недель
Стоп-реагент	от 2 до 8° С	до окончания срока годности набора

Перед началом работы набор выдержите при комнатной температуре 30 минут.

Раствор № 2, конъюгат, стоп-реагент, K⁺ и K⁻ готовы к применению.

В растворе № 2, возможно выпадение рыхлого комкующегося осадка, перед использованием его обязательно интенсивно встряхните до исчезновения осадка.

K⁺ и K⁻ перед использованием обязательно перемешайте.

7.1.1. Приготовление рабочего раствора № 1 для промывания планшетов.

Содержимое флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхните. При выпадении в концентрате кристаллов прогрейте его перед разведением при температуре от 35 °С до 37 °С до полного растворения. 4 мл концентрата раствора № 1 перенесите в мерную емкость, доведите объем до метки 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешайте.

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

7.1.2. Приготовление индикаторного раствора.

За 5-10 мин до окончания реакции с конъюгатом приготовьте рабочее разведение хромогена. Отберите 1 мл раствора № 4, поместите в чистую емкость и добавьте 0,1 мл хромогена в расчете на 1 стрип (8 лунок). Тщательно перемешайте.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с конъюгатом, 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. Избегайте также контакта этих реагентов с металлами.

7.2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ

7.2.1. Иммуносорбент освободите от упаковки, оставив в каретке количество стрипов, необходимое для проведения анализа. Остальные стрипы поместите обратно в пакет и храните в соответствии с условиями, указанными в таблице № 1.

7.2.2. Внесение испытуемых и контрольных образцов сывороток.

В две лунки внесите по 100 мкл K⁻, в две лунки - по 100 мкл K⁺. В остальные лунки внесите по 90 мкл раствора № 2 и по 10 мкл 10-кратно разведенных исследуемых образцов из планшета для предварительного разведения (см. п. 6.1.).

Планшет заклейте пленкой и выдержите в течение 30 мин при температуре (37±1)°С.

7.2.3. Промывание.

Удалите жидкость из лунок автоматическим или ручным промывателем.

Планшет пятикратно промойте рабочим раствором № 1 (см. п. 7.1.1.), внося в лунки по 250 мкл промывающего раствора и выдерживая раствор в лунках не менее 20 с. После промывания тщательно удалите 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!

7.2.4. Во все лунки планшета внесите по 100 мкл конъюгата. Планшет заклейте пленкой и выдержите в течение 30 мин при температуре (37 ± 1) °С.

7.2.5. Повторите пятикратно процедуры промывания, описанные в п. 7.2.3.

7.2.6. Во все лунки планшета внесите 100 мкл индикаторного раствора (п. 7.1.2.). Планшет поместите в защищенное от света место на (15 ± 2) мин при температуре $(18-25)$ °С.

Не располагайте планшеты стопкой!

7.2.7. Остановите пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и немедленно проведите учет результатов.

8. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение оптической плотности (ОП) проводите при длине волны 450 нм. Рекомендуемая длина волны сравнения (620-650) нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществляйте по воздуху.

Для проведения количественных расчётов используются специфические для каждой серии тест-системы параметры и калибровочная кривая, которые приводятся в приложении к инструкции.

В приложении к инструкции приводятся:

- калибровочная кривая, соответствующая данной серии, при построении которой использовался 1-й международный стандарт ВОЗ RUBI-1-94;
- номинальное значение оптической плотности для K^+ : ОП _{$K^+(N)$}
- наименьшее допустимое значение ОП для K^+ .

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

- Значения ОП K^- должны быть меньше 0,10 оптических единиц (о.е.).
- Среднее значение оптической плотности для K^+ должно быть выше наименьшего допустимого значения ОП для K^+ .

Для определения концентрации IgG антител к вирусу краснухи в МЕ/мл:

1. Рассчитайте среднее арифметическое значение ОП _{$K^+ ср.$} ;

2. Рассчитайте коэффициент С по формуле:

$$C = \text{ОП}_{K^+(N)} / \text{ОП}_{K^+ ср.}, \text{ используя значение ОП}_{K^+(N)}$$

3. Для каждого образца сыворотки рассчитайте скорректированное значение ОП_{коррект.} по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{коррект.}} = C \times \text{ОП образца}$$

4. По калибровочной кривой определите содержание IgG антител к вирусу краснухи в МЕ/мл для каждого образца.

Диапазон количественного определения находится в интервале от 5 до 100 МЕ/мл. Образцы, содержание антител в которых ниже этого диапазона,

интерпретируются как содержащие <5МЕ/мл, образцы, содержание антител в которых выше этого диапазона интерпретируются как содержащие >100МЕ/мл.

9. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В соответствии с рекомендациями ВОЗ критерием защищенности от краснухи является определение в сыворотке крови IgG антител к вирусу краснухи в концентрации более 10МЕ/мл. «Серая зона» определения составляет $\pm 20\%$, т.е. 8-12 МЕ/мл.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор транспортируйте и храните в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 °С до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование в течение 3 сут при температуре от 9 °С до 30 °С.

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

Рекламации на качество набора направляйте в ЗАО БТК «Биосервис» по адресу: 115088, г. Москва, а/я 20, тел./факс (495) 674-5605.

11. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.