

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____



ИНСТРУКЦИЯ

ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

«КРАСНУХА-IgG-АНТИТЕЛА» -

ТЕСТ-СИСТЕМА ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА G К ВИРУСУ КРАСНУХИ

1. Назначение

1.1 Количественное и качественное определение антител класса G к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови у лиц с подозрением на краснуху, а также у беременных женщин, и при проведении сероэпидемиологических исследований.

1.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 42 неизвестных, 4 калибровочных положительных образцов, 1 контрольного положительного образца, 1 контрольного отрицательного образца (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Принцип действия набора реагентов основан на непрямом иммуноферментном анализе. Анализ проводят в две стадии. На первой стадии исследуемые образцы инкубируют в лунках планшета с иммобилизованным антигеном вируса краснухи. Если в сыворотке (плазме) содержатся антитела к вирусу краснухи, образуется комплекс антиген-антитело. После промывки планшета в лунки планшета вносят антивидовой конъюгат (моноклональные антитела мыши к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена), который связывается с антителами класса G к вирусу краснухи, если они присутствуют в образце. Визуализация образовавшегося комплекса «антиген-антитело-конъюгат» происходит за счет ферментативной реакции пероксидазы с субстратной смесью и образования окрашенного продукта. После остановки ферментативной реакции раствором серной кислоты (стоп-реагент) результаты анализа учитывают фотометрически. Величина оптической плотности (ОП) окрашенной хромогенной смеси пропорциональна концентрации специфических антител в образце сыворотки или плазмы.

После измерения оптической плотности раствора в лунках и построения калибровочного графика рассчитывается концентрация IgG к вирусу краснухи в анализируемых образцах.

2.2 Состав набора

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном вируса краснухи (иммуносорбент) - 1 шт.;
- контрольный положительный образец на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgG к вирусу краснухи (K+) - 1 флакон (1,3 мл);
- калибровочные положительные образцы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества IgG к вирусу краснухи – 100, 50, 20, 5 ME/мл (A,B,C,D) – 4 флакона (по 1,3 мл).
- контрольный отрицательный образец на основе сыворотки крови человека, не содержащий IgG к вирусу краснухи (K-) - 1 флакон (1,5 мл);

- конъюгат мышинных моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, (Кг) - 1 флакон (0,4 мл);
- буферный раствор для разведения сывороток (РБР-С) - 1 флакон (11 мл);
- буферный раствор для разведения конъюгата (РБР-К) - 1 флакон (13 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПР-С) - 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т(концентрат x25)) - 1 флакон (26 мл);
- буферный раствор для субстрата (БРС) - 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ) - 1 флакон (0,7 мл);
- стоп-реагент - 1 флакон (6 мл);
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов - 1 шт.;
- пленка для заклеивания планшета - 2 шт.;
- ванночка для реагентов - 2 шт.;
- наконечники для пипетки на 4-200 мкл - 16 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика - 1 шт..

3. Аналитические и диагностические характеристики

Набор реагентов «Краснуха-IgG-антитела» предназначен для количественного и качественного определения антител класса G к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови человека. Определение IgG к вирусу краснухи используется для оценки иммунного статуса женщин во время беременности, а также для проведения сероэпидемиологических исследований.

Чувствительность набора - минимальная достоверно определяемая концентрация IgG к вирусу краснухи - составляет 5 МЕ/мл.

Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения IgG к вирусу краснухи в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «Краснуха-IgG-антитела» не превышает 8 %.

Линейность. Зависимость концентрации IgG к вирусу краснухи в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей IgG к вирусу краснухи, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5,0- 100 МЕ/мл и составляет 90-110 %.

Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» - соответствие измеренной концентрации IgG к вирусу краснухи предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольного положительного образца с известным содержанием IgG к вирусу краснухи и калибровочного положительного образца. Процент «открытия» составляет 90 – 110 %.

4. Меры предосторожности

4.1 Потенциальный риск применения набора – класс 2Б.

4.2 Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как в состав набора входят компоненты крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. Оборудование и материалы

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм;
- прибор, позволяющий производить инкубирование при температуре 37 ± 1 °C (термостат);

- промывочное устройство для планшетов;

- холодильник бытовой;

- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 20 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 20 до 300 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- перчатки резиновые хирургические (ГОСТ 3-88);

- бумага фильтровальная лабораторная (ГОСТ 12026-76);

- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл (ГОСТ 1770-74Е);

- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72).

6. Анализируемые образцы

Для проведения анализа используют образцы сыворотки или плазмы крови человека объемом не менее 20 мкл. Желательно использовать свежеприготовленные образцы сыворотки (плазмы) крови, допускается использование образцов, хранившихся при температуре 2 - 8 °C не более 7 сут, либо при минус 20 °C не более 3 мес.

Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность контаминации посторонней микрофлорой.

При необходимости осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования в течение 10-15 мин при 3000 об/мин.

Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией, не использовать термоинактивированные сыворотки и сыворотки с добавлением азида натрия. Избегать повторных циклов замораживания и оттаивания образцов. Для возможного повторного исследования образца сыворотки желательно образец разделить на аликвоты, которые хранить при температуре 2 - 8 °C не более 7 сут, либо при минус 20 °C не более 3 мес.

Не допускать тестирование пула, содержащего несколько образцов сывороток. Каждый образец сыворотки или раствора необходимо отбирать новым наконечником. Для отбора исследуемых проб и компонентов применять автоматические пипетки.

7. Проведение анализа

7.1 Подготовка к анализу

7.1.1 Извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре 18-25 °C в течение времени не менее 30 мин.

7.1.2 Подготовка планшета.

Вынуть из пакета и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в герметично закрытом пакете при температуре 2 - 8 °C в течение всего срока годности.

7.1.3 Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т

Содержимое флакона с ФСБ-Т (концентрат х25) перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл и довести объем раствора до 650 мл дистиллированной водой. При наличии во флаконе ФСБ-Т(концентрат х25) осадка солей, флакон выдержать при температуре 37 °С до полного растворения солей.

В случае использования одного или нескольких стрипов разборного планшета в мерный цилиндр внести концентрат ФСБ-Т из флакона и добавить дистиллированную воду в соответствии с таблицей.

Хранение: неиспользованный ФСБ-Т (концентрат х25) хранить при температуре 2 - 8 °С в течение срока годности набора, рабочий раствор ФСБ-Т – при температуре 2 - 8 °С не более 5 сут.

7.1.4 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата подбирается для каждой серии тест-системы.

При постановке ИФА на полном планшете (12 стрипов) из флакона с Кг отобрать объем конъюгата, указанный в таблице для полного планшета (12 стрипов) и перенести его во флакон с РБР-К. Раствор тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

При постановке ИФА на одном или нескольких стрипах разборного планшета в чистый флакон отобрать необходимый объем РБР-К и добавить соответствующий объем конъюгата, исходя из приведенной ниже таблицы. Раствор тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

Хранение: рабочий раствор конъюгата хранить при температуре 20 - 25 °С не более 15 мин. При использовании нескольких стрипов планшета остаток конъюгата хранить при температуре 2 - 8 °С в течение срока годности набора.

7.1.5 Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

При постановке ИФА на полном планшете (12 стрипов) из флакона с ТМБ отобрать 650 мкл раствора и перенести его во флакон с БРС, тщательно перемешать.

В случае использования одного или нескольких стрипов планшета в чистый флакон отобрать необходимый объем БРС и добавить соответствующий объем ТМБ (см. таблицу).

Хранение: рабочий раствор хромогена хранить при температуре 20 - 25 °С в защищенном от света месте не более 20 мин, остаток ТМБ хранить при температуре 2 - 8 °С в течение срока годности набора.

Внимание! Отбирать концентрат ТМБ только новыми наконечниками для пипеток.

Расход реагентов набора «Краснуха-IgG-антитела»

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т												
ФСБ-Т (концентрат х25), мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26
Вода дистиллированная, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 650
Приготовление рабочего раствора конъюгата												
РБР-К, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
Конъюгат, мл	х*	2х	3х	4х	5х	6х	7х	8х	9х	10х	11х	13х
Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина												
БРС, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
ТМБ, мл	0,050	0,100	0,150	0,200	0,250	0,300	0,350	0,400	0,450	0,500	0,550	0,650

* х - объем конъюгата - подбирается для каждой серии на производстве тест-систем при изготовлении наборов

7.1.6 Приготовление калибровочных и контрольных образцов
Калибровочные и контрольные образцы готовы к использованию
Хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

7.1.7 Приготовление РБР-С, РПР-С, РБР-К, стоп-реагента
РБР-С, РПР-С, РБР-К, стоп-реагент – готовы к использованию.

После вскрытия флакона хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

7.1.8 Подготовка исследуемых образцов сывороток

Исследуемые сыворотки развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РПР-С). Для этого в лунки вспомогательного планшета внести по 90 мкл РПР-С и по 10 мкл исследуемых сывороток, тщательно перемешать. Цвет раствора после добавления сывороток должен измениться.

Хранение: не более 3 ч при температуре 20 - 25 °С.

7.2. Проведение иммуноферментного анализа

ПЕРВАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.1 В лунки А, В, С и D 1-го и 2-го рядов планшета внести калибровочные положительные образцы А(100 МЕ/мл), В(50 МЕ/мл), С(20 МЕ/мл) и D(5 МЕ/мл) по 100 мкл, в лунки Е этих же рядов внести по 100 мкл контрольного положительного образца К+, в лунки F этих же рядов внести по 100 мкл контрольного отрицательного образца К-. В остальные лунки планшета внести по 90 мкл РБР-С и по 10 мкл предварительно разведенных образцов исследуемых сывороток (см. п.7.1.8). Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 100 раз.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 5-7 мин.

После этого планшет закрыть пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1) °С.

Внимание! Пленка предназначена для одноразового использования!

7.2.2. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором (6 %-ный раствор перекиси водорода). Планшет с иммобилизованным антигеном промыть 5 раз рабочим раствором ФСБ-Т с помощью промывателя или многоканальной пипетки, при этом в каждую лунку планшета вносить не менее 250 мкл раствора в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 10 сек, по окончании промывки остатки жидкости удалить, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

ВТОРАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.3. В каждую лунку планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см. приготовление п.7.1.4). Планшет закрыть пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1) °С.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.2.4 По окончании второй инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т 5 раз и удалить остатки влаги из планшета (см. п.7.2.2).

ТРЕТЬЯ (ФЕРМЕНТАТИВНАЯ) СТАДИЯ РЕАКЦИИ

7.2.5. Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см. приготовление п.7.1.5). Планшет поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре (37±1) °С.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Во избежание ложных результатов при распылении рабочего раствора тетраметилбензидина:

а) не касайтесь стенок лунок планшета наконечниками;

б) избегайте образования аэрозолей и попадания субстратной смеси на внутренний фильтр пипетки.

7.2.6 Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

Внимание! Следует избегать попадания стоп-реагента на открытые участки тела и одежду. При попадании - промыть большим количеством воды!

Схема проведения анализа

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном вируса краснухи



Внести:

ПЕРВАЯ СТАДИЯ
РЕАКЦИИ

2x100 мкл А, В, С, D – калибровочных положительных образцов

2x100 мкл - контрольного положительного образца

2x100 мкл - контрольного отрицательного образца

в остальные лунки по 90 мкл РБР-С и по 10 мкл предварительно разведенных образцов сывороток



Инкубировать 30 мин, при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$



Промыть:

рабочим раствором ФСБ-Т (не менее 250 мкл в каждую лунку), 5 раз



ВТОРАЯ СТАДИЯ
РЕАКЦИИ

Внести:

по 100 мкл рабочего раствора конъюгата



Инкубировать 30 мин, при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$



Промыть:

рабочим раствором ФСБ-Т (не менее 250 мкл в каждую лунку), 5 раз



ТРЕТЬЯ
(ФЕРМЕНТАТИВНАЯ)
СТАДИЯ
РЕАКЦИИ

Внести:

по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина



Инкубировать 15 мин при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в защищенном от света месте



Внести:

по 50 мкл стоп-реагента



Измерять при 450 нм

8. Регистрация результатов анализа

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм. Нулевой уровень («бланк») задают по воздуху. Измерение проводят сразу или в течение 15 мин после остановки реакции.

9. Учет результатов

Результаты учитывают только в том случае, если:

- среднее значение ОП в лунках с калибровочным положительным образцом А (ОП А)ср не менее 1,5;
- среднее значение в лунках с К- (ОПК-)ср. не более 0,2;
- соотношение средних значений оптических плотностей калибровочных проб: ОП(К-) < ОП(Д) < ОП(С) < ОП(В) < ОП(А);
- вычисленная по калибровочному графику концентрация иммуноглобулинов Краснуха-IgG (в МЕ/мл) в контрольном положительном образце совпадает, в пределах доверительного интервала, с указанной на этикетке контрольного положительного образца.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Интерпретация результатов

Исследуемые образцы учитываются:

- как положительные при ОП больше 1,1х (ОП Д)ср;
- как отрицательные при ОП меньше 0,9 х (ОП Д)ср;
- как сомнительные при ОП в диапазоне от 0,9 х (ОП Д)ср до 1,1х (ОП Д)ср.

При получении сомнительных результатов исследуемые образцы сывороток рекомендуется исследовать повторно. Если результаты опять попадут в пределы сомнительных, следует провести тестирование образцов сывороток, отобранных через 2-4 недели. Если и в данном случае результаты попадут в пределы сомнительных, образцы сывороток считать отрицательными.

Для количественного учета результатов (содержание антител класса G к вирусу краснухи в исследуемых образцах сывороток в МЕ/мл) необходимо построить калибровочный график (для этого использовать трафарет из набора): на оси ординат отложить средние значения оптических плотностей калибровочных образцов (А,В,С,Д), а на оси абсцисс соответствующие значения концентраций (в МЕ/мл), построить калибровочную кривую. Для определения концентрации IgG к вирусу краснухи в анализируемой пробе на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую до пересечения с калибровочной кривой, от полученной точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. Полученное значение на оси абсцисс будет соответствовать концентрации иммуноглобулинов Краснуха-IgG в исследуемом образце в МЕ/мл.

Анализируемые образцы, показавшие в ИФА оптическую плотность большую, чем ОП калибровочного образца А (100 МЕ/мл), следует развести дополнительно.

При значениях ОП образцов выше (ОПА)ср. необходимо предварительно развести их в 2 раза раствором для предварительного разведения сывороток (РПР-С) и повторить исследование согласно схеме проведения ИФА. Анализируемые сыворотки, таким образом, в исследовании разбавляются в 200 раз. При подсчете концентрации необходимо учесть фактор разведения, т.е. умножить полученный результат на коэффициент 2.

Если и в этом случае ОП образцов выше (ОПА)ср. необходимо предварительно развести их в 4 раза раствором для предварительного разведения сывороток (РПР-С) и повторить исследование согласно схеме проведения ИФА. Анализируемые сыворотки, таким образом, в исследовании разбавляются в 400 раз. При подсчете концентрации необходимо учесть фактор разведения, т.е. умножить полученный результат на коэффициент 4.

Дифференцировать первичную инфекцию от паст-инфекции помогает комплексный подход к диагностике – сопоставление данных всего спектра серологических маркеров инфекции:

- результатов выявления специфических IgM;
- определения индекса авидности IgG и концентрации IgG в динамике.

Анализ серологического профиля пациента позволяет определить вероятный срок инфицирования вирусом краснухи.

10. Условия хранения и эксплуатации набора

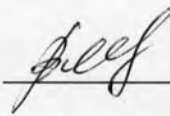
Набор реагентов «Краснуха-IgG-антитела» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2 - 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

Срок годности набора реагентов 12 мес. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит

Транспортирование производить при температуре 2 - 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С в течение 5 сут. На дальние расстояния только авиатранспортом.

По вопросам, касающимся качества набора «Краснуха-IgG-антитела», следует обращаться в ООО «ИмДи-спектр» по адресу:
630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-он, п. Кольцово, д.2а;
тел/факс (383) 336-76-23

Начальник производства
ООО «ИмДи-спектр»

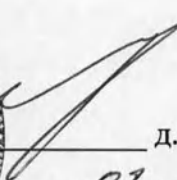
 В.Г Майданюк
«___» _____ 20__ г.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики

ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»



 д.м.н., профессор В.В. Долгов
«02» августа 2010 г.

