



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К ВИРУСУ КРАСНУХИ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ИФА-Рубелла-IgG

Утверждена министерством здравоохранения Республики Беларусь
28.05.2009 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор предназначен для количественного анализа сыворотки или плазмы крови человека на наличие антител класса IgG к вирусу краснухи (Rubella Virus) методом иммуноферментного анализа.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Общая характеристика

Вирус краснухи (Rubella Virus) относится к семейству Togaviridae и является РНК-содержащим вирусом. Механизм передачи возбудителя - воздушно-капельный. Вирус вызывает широко распространенное заболевание со слабовыраженными симптомами, характеризующееся лихорадкой, лимфаденопатией, пятнисто-узелковой сыпью. Однако часть случаев протекает в бессимптомной форме, что усложняет клиническую диагностику краснухи. В детском возрасте это заболевание обычно не дает осложнений. При первичном инфицировании в первом триместре беременности существует значительный риск получения серьезных повреждений плода, поэтому беременные, не имеющие IgG антител к вирусу краснухи, являются восприимчивыми к инфекции и относятся к группе риска.

Для оценки уровня защитного иммунитета против краснухи наиболее широкое распространение получил метод иммуноферментного анализа. Наличие в крови специфических IgG антител к вирусу краснухи является показателем перенесенной в прошлом инфекции или проведенной вакцинации. У пациентов с острой инфекцией в динамике наблюдается увеличение уровня специфических IgG.

2.2. Состав набора:

№	Наименование компонента:	Количество
1	Иммуносорбент	1 шт
2	Конъюгат	1 микропробирка; 1,5 мл
3	(К)	1 микропробирка; 0,2 мл
4	(K ₁ ⁺) (10 МЕ/мл)	1 микропробирка; 0,2 мл
5	(K ₂ ⁺) (100 МЕ/мл)	1 микропробирка; 0,2 мл
6	КРП	2 флакона, 25мл
7	РРС	2 флакона, 30мл
8	РРК	1 флакон, 15мл
9	СБР	1 флакон, 8мл
10	ТМБ	1 флакон, 8мл
11	Стоп-реагент	1 флакон, 15мл
12	Клейкая пленка	3 шт

Принцип анализа ИФА- Рубелла-IgG базируется на методе твердофазного непрямого ИФА.

При внесении в лунки образцов исследуемых сывороток антитела класса IgG к вирусу краснухи, в случае их наличия, связываются с антигенами вируса, сорбированными на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы выявляют при помощи пероксидазного конъюгата моноклональных антител к иммуноглобулину класса IgG человека. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют субстратный буфер (перекись водорода) и раствор ТМБ. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность смеси в лунках при длине волны 450/620 нм, которая пропорциональна концентрации специфических IgG антител к вирусу краснухи в образцах сывороток или плазмы крови.

Концентрация антител класса IgG к вирусу краснухи может быть выражена в Международных единицах (МЕ) с использованием калибровочной кривой. Положительные контрольные сыворотки, используемые для построения кривой, атестованы относительно 1-го Международного стандарта ВОЗ – Anti-Rubella immunoglobulin, Human, RUBI-1-94 (NIBSC).

2.3 Набор рассчитан на проведение 96 анализов (включая контроли).

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Рекombинантные антигены-полипептиды, синтезированные в бактериях E.coli и содержащиеся в наборе "ИФА- Рубелла-IgG" являются биологически безопасными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое

может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.5 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток (плазмы), содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток или плазмы хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20 °С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

Необходимо помнить, что образец с добавленным азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина или бактериальным проростом не пригоден для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;

- необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- 5.1 Фотометр для измерения оптической плотности;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
 - пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,01 до 5,0 мл (от 10 до 5000 мкл);
 - пипетки 8-ми канальные полуавтоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,01 до 0,3 мл (от 10 до 300 мкл);
 - суховоздушный термостат настроенный на температуру 37 °С;
 - мерные цилиндры вместимостью 10, 50 и 1000 мл;
 - стакан мерный вместимостью 3000 мл;
 - ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
 - флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
 - клейкая пленка или крышка;
 - бумага фильтровальная;
 - перчатки резиновые хирургические;
 - вода дистиллированная;
 - контейнер для сбора твердых отходов;
 - контейнер для слива жидких отходов.

6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

(из расчета на 96 лунок)

6.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при комнатной температуре (18-22) °С в течение 30 мин.

6.2 Приготовление раствора для промывания планшета
Если КРП содержит кристаллы, его необходимо перед использованием прогреть при температуре (35-37) °С до полного растворения кристаллов.

Содержимое флакона с КРП интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. Отобрать 48 мл концентрата в мерный стакан вместимостью 3000 мл, добавить 2160 мл дистиллированной воды и перемешать раствор стеклянной палочкой в течении (40-60) с.

Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 10 суток.

6.3 Приготовление раствора конъюгата

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит!

В чистый флакон (с пробкой) вместимостью 20 мл внести 10 мл РРК, добавить 1 мл конъюгата. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

6.4 Приготовление ТМБ-субстратного раствора

ВНИМАНИЕ! ТМБ-субстратный раствор готовят непосредственно перед использованием!

В чистый флакон (с пробкой) вместимостью 20 мл внести 6 мл СБР, добавить 6 мл раствора ТМБ и интенсивно перемешать смесь в течение (20-30) с.

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием ТМБ-субстратный раствор должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с ТМБ-субстратным раствором, отмыть без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники

6.5 Разведение сывороток (образцов и контролей)

Исследуемые образцы сывороток, отрицательные и положительные контрольные сыворотки необходимо развести в соотношении 1:51 раствором для разведения сывороток, к 500 мкл РРС добавить 10 мкл сыворотки или контроля.

7 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматическое или полуавтоматическое устройство для промывания планшетов – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них; лунки должны заполняться до краев (0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;
- полностью удалить раствор из лунок.
- на поверхности рамки и стрипов после последней аспирации не должно быть остатков жидкости. Удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге;
- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Иммуносорбент освободить от упаковочного пакета.

8.2 Приготовить раствор для промывания планшета (п.6.2) и раствор конъюгата (п. 6.3).

8.3 Внести предварительно разведенные по п. 6.5 исследуемые сыворотки и контрольные сыворотки:

- в лунку А1 – 0,1 мл (К),
- в лунку В1 – 0,1 мл (К₁⁺),
- в лунку С1 – 0,1 мл (К₂⁺),
- в остальные лунки – по 0,1 мл исследуемых сывороток.

8.4 Накрыть планшет клейкой пленкой или крышкой и инкубировать при температуре (37±2) °С в течение 30 минут.

8.5 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки, затем все лунки промыть 4 раза раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п. 7).

8.6 Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора конъюгата.

8.7 Планшет закрыть новой пленкой или крышкой и инкубировать при комнатной температуре (37±2)°С в течение 30 мин.

8.8 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки, затем все лунки промыть 6 раз раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п. 7).

8.9 Приготовить ТМБ-субстратный раствор (п.6.4).

8.10 Внести в лунки планшета по 0,1 мл раствора ТМБ-субстрата. Планшет закрыть новой пленкой или крышкой и инкубировать при комнатной температуре (18-25)°С в защищенном от света месте в течение 30 мин.

8.11 Остановить реакцию путем внесения во все лунки планшета по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента (в той же последовательности внесения, что и ТМБ-субстратный раствор).

8.12 Не позже чем через 5 мин после остановки реакции, определить ОП в лунках в двухволновом режиме: при длине волны 450 нм относительно 620 нм.

Оптическую плотность можно измерять в одноволновом режиме (450 нм) относительно пустой лунки (бланк). Необходимо предусмотреть пустую лунку при анализе.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1 Результаты учитывают только при соблюдении следующих условий:

- ОП (К), не должно превышать 0,2 ОЕ;
- ОП (К₁⁺) должно быть не ниже 0,2 ОЕ;
- ОП (К₂⁺) должно быть не ниже 1,0 ОЕ.

9.2 Концентрация IgG антител к Rubella Virus в образце может быть выражена в Международных единицах (МЕ). Для получения

количественного результата в МЕ/мл следует построить калибровочную кривую. Для этого следует отложить по оси Y значения ОП контрольных сывороток: отрицательной и двух положительных (1 и 2), а на оси X соответствующие им концентрации – 0, 10, 100 МЕ/мл.

9.3 Используя построенную кривую, определить концентрацию IgG в МЕ/мл для каждого исследуемого образца согласно полученному значению оптической плотности.

Если ОП исследуемого образца в разведении 1:51 больше 3,0 ОЕ, рекомендуется исследовать эту сыворотку в разведении 1:510. При расчете концентрации IgG этого образца в МЕ/мл умножить полученное значение на 10.

Для автоматического учета результатов анализов могут использоваться соответствующие компьютерные программы.

9.4 Результат каждого анализа оценивают следующим образом:

> 12 МЕ/мл	положительный
10 – 12 МЕ/мл	неопределенный
< 10 МЕ/мл	отрицательный

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Положительный результат на IgG антитела к вирусу краснухи может свидетельствовать о наличии постинфекционного иммунитета после перенесенного в прошлом заболевания; успешно проведенной вакцинации или подтверждать наличие острой инфекции.

При первичной инфекции специфические IgM начинают выявляться на 3-4 сутки и достигают максимума на 7-10 сутки. Потом содержание специфических IgM начинает снижаться в течение 4-5 недель. Специфические IgG начинают выявляться на 5-7 сутки после появления сыпи, достигают максимума через 4-5 недель и долгое время остаются на высоком уровне. Рекомендуется для подтверждения острой инфекции провести анализ на наличие специфических IgM, а также тестирование специфических IgG антител в парных сыворотках, взятых от больного через 10-15 суток после первого забора крови. Тестирование парных сывороток необходимо проводить параллельно в одной постановке ИФА. Если в парных сыворотках регистрируется повышение концентрации специфических IgG более чем на 30 % – это свидетельствует о первичной инфекции или реактивации.

Для определения эффективности вакцинации в одной постановке ИФА исследуют наличие специфических IgG в парных сыворотках крови, взятых у пациента до вакцинации и через 8 недель после нее. Отрицательный результат при тестировании сыворотки до вакцинации и положительный после – указывает на ее эффективность.

Отрицательный результат на специфические IgG указывает на отсутствие защитного иммунитета против вируса краснухи. Это опасно для беременных женщин и относит их к группе риска. Рекомендуется таких женщин при диспансерном осмотре ежемесячно обследовать на наличие специфических маркеров к вирусу краснухи.

Материнские IgG к вирусу краснухи циркулируют у ребенка после рождения в течение 6 месяцев. Обнаружение у ребенка антител класса IgM свидетельствует о наличии врожденной инфекции.

При неопределенном результате тестирования на специфические IgG к краснухе образец рекомендуется исследовать повторно не менее чем в двух лунках. Если при повторном исследовании образец снова выявляется как неопределенный, это может свидетельствовать о начале заболевания и пациента рекомендуется обследовать на наличие специфических IgM, а через 7-14 дней провести повторный анализ на наличие специфических антител класса IgG к краснухе.

10.2 Ограничения теста

Для постановки окончательного диагноза следует учитывать не только данные серологического теста, но и клиническую картину заболевания. Пациенты с предполагаемой первичной инфекцией должны пройти тестирование одновременно на IgG и IgM антитела к вирусу краснухи.

Отрицательный результат тестирования на специфические антитела классов IgG и IgM к вирусу краснухи может регистрироваться в период сероконверсионного окна, которое составляет 2-3 недели от начала инфицирования.

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

11.1. Набор транспортируется всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С.

11.2. Хранение набора должно производиться в чистом, сухом и темном помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Замораживать набор запрещается.

11.3 Срок годности набора – 1 год.

Библиография

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г. О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ № 351 от 16.12.98 г. Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [3] ОСТ 42-21-2-85 Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы