

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса М
к вирусу краснухи

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ВекторРубелла-IgM

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-2554



1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВектоРубелла-IgM» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу краснухи в сыворотке (плазме) крови человека, и может быть использован для диагностики первичного инфицирования вирусом краснухи методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Прогноз при заболевании краснухой в основном благоприятный, за исключением врожденной краснухи и осложнений в виде артрита, тромбоцитопенической пурпуры и наиболее тяжелого осложнения – краснушного энцефалита. Особую опасность краснуха представляет для беременных вследствие внутриутробной инфекции плода. Частота поражений плода зависит от сроков беременности. Заболевание краснухой в первый триместр беременности наиболее опасно и обуславливает врожденные уродства у будущего ребенка в 60% случаев. Это – задержка в развитии, поражения зрения и слуха, врожденные пороки сердца, поражения костей конечностей, черепа и др. Поэтому рекомендуется проведение систематического серологического анализа у женщин репродуктивного возраста для выявления группы риска (с отсутствием антител к вирусу краснухи).

В первый триместр беременности рекомендуется проверять наличие IgG к вирусу краснухи. Увеличение титра в образцах сывороток,

взятых с интервалом 10–15 дней, свидетельствует о развитии инфекционного процесса. Для диагностики острой фазы заболевания рекомендуется дополнительное определение IgM и индекса avidности (ИА) IgG к вирусу краснухи.

1.3. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованным антигеном вируса краснухи. Имеющиеся в сыворотке специфические антитела к вирусу связываются с иммобилизованным антигеном. Несвязавшийся материал удаляют отмывкой.

Связавшиеся антитела выявляют при инкубации с конъюгатом антител к IgM человека с пероксидазой хрена. После второй отмывки количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием хромогена – раствора тетраметилбензидина (ТМБ).

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках. Интенсивность желтого

окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце IgM к вирусу краснухи.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный с иммобилизованным антигеном вируса краснухи – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+ ; прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^- ; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 3,0 мл;
- конъюгат (моноклональные антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена, прозрачная жидкость синего цвета) – 1 фл., 13 мл;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС; прозрачная жидкость малинового цвета) – 1 фл., 10 мл;
- раствор для разведения сывороток (PPC; светло-желтая жидкость с легкой опалесценцией) – 1 фл., 12 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25; прозрачная бесцветная или с легкой опалесценцией жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре от 30 до 40 °С в течение 20 мин) – 2 фл. по 28 мл;
- раствор тетраметилбензидина (прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 13 мл;

- стоп-реагент (прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки – 16 шт.;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность и специфичность – 100% при проверке на сыворотках стандартной панели предприятия (СПП), содержащих и не содержащих иммуноглобулины класса М к вирусу краснухи.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. *В случае попадания стоп-реагента 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 образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , дioxлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

4.8. Точность и воспроизводимость результатов анализа зависят от строгого выполнения следующих правил:

- не используйте реагенты с истекшим сроком годности;

- при постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест»;

- *запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей;*

- не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

- используйте стеклянную посуду, тщательно вымытую и ополоснутую дистиллированной водой, или (предпочтительно) одноразовую посуду;

- не допускайте высыхания стрипов в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов;

- ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором тетраметилбензидина;

- избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими при-

месями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

– необходимо следить за состоянием промывочного устройства – регулярно обрабатывать шланги и емкости 70% этиловым спиртом;

– рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

– никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

– перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протирать конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона с раствором ТМБ;

– проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы;

– если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Ложноположительные результаты могут быть обусловлены получением неправильного рабочего разведения исследуемых сывороток.

Для получения правильного рабочего разведения исследуемых сывороток:

а) при отборе 10 мкл сыворотки для предварительного разведения не погружайте нако-

нечник глубоко в сыворотку, чтобы исключить налипание сыворотки на внешнюю поверхность наконечника.

б) тщательно перемешивайте сыворотку при предварительном разведении 1:10.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,5 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;

- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 6 мес. Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

6.4. Для отбора исследуемых образцов и компонентов набора реагентов использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа исследуемые образцы и все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, следует выдержать при температуре от 18 до 25°C не менее 60 мин.

7.2. Контрольные образцы, конъюгат, раствор ТМБ и стоп-реагент готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

7.3. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

7.3.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

7.3.2. После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение трех месяцев, но в пределах срока годности набора.

7.4. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C в течение 3 месяцев.

7.5. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ (ПЛАЗМЫ)

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток. Для этого внести в лунки вспомогательного планшета по 90 мкл раствора и добавить по 10 мкл цельной сыворотки (плазмы), тщательно перемешать. При этом малиновый цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, данный образец может дать неправильный результат.

Хранение: не более 3 часов при температуре 18–25°C.

7.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз.

Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

Хранение: не более 5 суток при 2–8°C.

7.7. ПОДГОТОВКА КОНЪЮГАТА

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т, концентрат, мл	Вода дистил., мл
1	1,0	1,0	2,0	до 100
2	2,0	2,0	4,0	до 150
3	3,0	3,0	6,0	до 200
4	4,0	4,0	8,0	до 250
5	5,0	5,0	10,0	до 300
6	6,0	6,0	12,0	до 350
7	7,0	7,0	14,0	до 400
8	8,0	8,0	16,0	до 450
9	9,0	9,0	18,0	до 500
10	10,0	10,0	20,0	до 550
11	11,0	11,0	22,0	до 600
12	12,0	12,0	24,0	до 100

чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (*не сливать во флакон с исходным конъюгатом*).

7.8. ПОДГОТОВКА РАСТВОРА ТМБ

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов),

отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ.

Остатки раствора ТМБ из флакона или ванночки утилизировать (*не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ*).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

В растворе РРС возможно выпадение осадка. Перед использованием встряхнуть.

8.1. Внести контрольные образцы:

- 1 лунка – 100 мкл K^+ ;
- 2 лунки – по 100 мкл K^- .

Например, в лунки А-1 и В-1 внести по 100 мкл K^- , в лунку С-1 внести 100 мкл K^+ .

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток (плазмы) крови (п. 7.5), тщательно перемешать.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37°C.

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.6.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (п. 7.7).

Отрезать пленку требуемого размера. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре 37°C.

Для внесения конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в комплект набора.

8.4. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз, как описано в п. 8.2.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ (п. 7.8.) и инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре 18–25°C.

Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.6. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двух-волновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

- Внести:** по 100 мкл K^+ , K^- ;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл исследуемых сывороток, предварительно разведенных в РПРС.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора ТМБ.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср. K^-}$).

11.2. Результаты исследований следует учитывать при соблюдении следующих условий:

– среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,25 ед. опт. плотн. (о.е.);

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,7 о.е.

11.3. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит.}$) по формуле:

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср. K^-} + 0,2$$

11.4. Результат анализа считать **положительным**, если $ОП_{обр.} \geq ОП_{крит.}$, где $ОП_{обр.}$ – оптическая плотность в лунках с исследуемыми образцами.

Результат анализа считать **отрицательным**, если $ОП_{обр.} < 0,8 \times ОП_{крит.}$.

Исследуемый образец расценивать как **сомнительный**, если соответствующее ему значение $ОП_{обр.}$ находится в диапазоне от $0,8 \times ОП_{крит.}$ до $ОП_{крит.}$.

11.5. Сомнительные образцы анализируют повторно. При повторном сомнительном результате необходимо проанализировать сы-

воротку, взятую через 10–15 дней после первого забора.

11.6. Если пациент обследуется в начале острой фазы заболевания, полученный отрицательный результат анализа еще не означает отсутствия инфицирования вирусом краснухи, т.к. в это время IgM к нему могут еще не появиться. Поэтому рекомендуется взять кровь у пациента через 10–15 дней и вновь проанализировать ее на наличие иммуноглобулинов класса М.

11.7. Увеличение концентрации IgM в парных образцах свидетельствует об острой инфекции.

11.8. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации иммуноглобулинов класса М к вирусу краснухи в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Набор реагентов «ВектоРубелла-IgM» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (9 мес). Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание набора не допускается.

12.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее **3 месяцев** с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности.

12.3. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

**По вопросам, касающимся качества
набора реагентов, следует обращаться
в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:**

630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район,
п. Кольцово, а/я 121,
тел. /факс (383) 336-73-46,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

За справками и консультацией обращаться:
в лабораторию герпес-вирусных инфекций,
тел. (383) 227-75-43

26.10.10.

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
ТОРСН-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: www.vector-best.ru