



Vitrotest[®]

Vitrotest Rubella-IgG

**Імуноферментна тест-система
для кількісного визначення антитіл класу IgG
до вірусу краснухи**

Інструкція з використання

1. Призначення
2. Клінічне значення
3. Принцип аналізу
4. Матеріали та обладнання
5. Застереження та техніка безпеки
6. Зберігання та стабільність
7. Підготовка зразків
8. Розведення зразків та підготовка реагентів
9. Процедура аналізу
10. Облік результатів та їх інтерпретація
11. Діагностичні характеристики тесту
12. Обмеження аналізу

Література

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK003

«Vitrotest Rubella-IgG»
Імуноферментна тест-система для кількісного визначення
антитіл класу IgG до вірусу краснухи

1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest Rubella-IgG» призначена для кількісного визначення антитіл класу IgG до вірусу краснухи у сироватці чи плазмі крові людини.

Тест-набір може бути застосований як для проведення ІФА з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

2. Клінічне значення

Краснуха – вірусне інфекційне захворювання, яке характеризується висипаннями на шкірі, генералізованою лімфаденопатією, помірною інтоксикацією та нетривалою лихоманкою. Зазвичай хвороба протікає швидко та у легкій формі. Особливе значення краснухи як інфекційного захворювання пов'язане з небезпекою тяжких уражень плоду, що можуть розвинутиися при інфікуванні матері в період вагітності.

Зважаючи на те, що симптоми захворювання на краснуху часто мало виражені, а у 30-50 % випадків хвороба перебігає без помітних проявів, важливого значення набули лабораторні методи діагностики.

Після вакцинації, як і при первинному інфікуванні вірусом краснухи, першими в крові з'являються специфічні імуноглобуліни класу IgM, які є свідченням реплікації вірусу в організмі людини. Після зараження специфічні IgM з'являються на 3-5-у добу від появи висипань, а після вакцинації антитіла цього класу починають виявлятися на 3-4-му тижні і присутні в крові протягом кількох тижнів. Специфічні антитіла класу IgG з'являються в крові на 7-10-у добу з моменту клінічних проявів, досягають максимуму через 4-5 тижнів та залишаються на високому рівні протягом тривалого часу.

Надійним доказом гострої краснушної інфекції є присутність у сироватці специфічних антитіл класу IgM, значне підвищення рівня (не менш як в два рази) специфічних антитіл класу IgG, виділення вірусу в культурі або позитивний результат полімеразної ланцюгової реакції.

Антитіла класу IgG проти вірусу краснухи можна вважати ознакою перенесеної краснушної інфекції, адже наявність цих антитіл у сироватці крові обстежуваної особи свідчить про закінчення активного інфекційного процесу. Визначення рівня специфічних антитіл класу IgG дає змогу оцінити напруженість імунітету після перенесеної інфекції або вакцинації та прогнозувати можливість розвитку захворювання у випадку повторного інфікування.

3. Принцип аналізу

Визначення антитіл класу IgG до вірусу краснухи в тест-системі «Vitrotest Rubella-IgG» базується на принципі «непрямого» твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА).

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованими в лунках очищеними антигенами інактивованого вірусу краснухи. Під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування специфічних до вірусу краснухи антитіл з антигеном на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додається кон'югат специфічних до IgG людини моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, що зв'язується з імуноними комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імуноних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). В результаті реакції розчин в лунках де утворились імуноні комплекси забарвлюється в синій колір. Реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту, при цьому синій колір забарвлених лунок змінюється на жовтий. Результат аналізу визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620 нм.

Внутрішні калібратори тест-системи «Vitrotest Rubella-IgG» стандартизовані за Першим Міжнародним Стандартом Anti-Rubella Immunoglobulin, Human RUBI-I-94 (NIBSC, WHO).

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

ІФА-планшет – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок) з іммобілізованим антигеном вірусу краснухи.

Калібратор K0 – 1 мікропробірка, що містить 0,2 мл негативної сироватки крові людини (жовтий).

Калібратор K10 – 1 мікропробірка, що містить 0,2 мл розчину специфічних до вірусу краснухи імуноглобулінів IgG людини у концентрації 10 МО/мл у фосфатному буфері із стабілізаторами та консервантами (зелений).

Калібратор K50 – 1 мікропробірка, що містить 0,2 мл розчину специфічних до вірусу краснухи імуноглобулінів IgG людини у концентрації 50 МО/мл у фосфатному буфері із стабілізаторами та консервантами (помаранчевий).

Калібратор K100 – 1 мікропробірка, що містить 0,2 мл розчину специфічних до вірусу краснухи імуноглобулінів IgG людини у концентрації 100 МО/мл у фосфатному буфері із стабілізаторами та консервантами (рожевий).

Розчин для попереднього розведення сироваток РПРС – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину з детергентом та консервантом (коричнево-зелений).

Розчин для розведення сироваток РРС – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину з детергентом та консервантом (жовтий).

Розчин кон'югату РК – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину моноклональних антитіл до IgG людини, кон'югованих з пероксидазою хрому, із стабілізаторами та консервантом (фіолетовий). Готовий до використання.

Розчин для промивання Tw20 (20x) – 1 флакон, що містить 50 мл 20-ти кратного концентрату фосфатного буферу з Твіном-20 (безбарвний).

Розчин ТМБ – 1 флакон, що містить 12 мл розчину ТМБ і перекису водню з стабілізатором та консервантом (безбарвний).

Стоп-реагент – 1 флакон, що містить 12 мл розчину 0,5 М сірчаної кислоти (безбарвний).

Планшет для попереднього розведення зразків - 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок)

Клейка плівка – 2 аркуші плівки для заклеювання планшетів під час інкубації.

Бланк внесення проб – 1 аркуш для запису схеми внесення зразків.

Бланк калібрувального графіку – 1 аркуш для побудови калібрувального графіку.

Інструкція – 1 екземпляр інструкції з використання.

4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

Для постановки аналізу необхідні такі додаткові реактиви, матеріали та обладнання:

- деіонізована або дистильована вода;
- фільтрувальний папір;
- мірні циліндри на 10, 200 та 1000 мл;
- одноразові рукавички;
- розчин перекису водню 6%;
- одноразовий або чистий посуд для приготування реактивів (флакони та ванночки);
- таймер;
- одно- та багатоканальні автоматичні піпетки змінного об'єму на 20, 200 та 1000 мкл та наконечники до них;
- термостат на 37°C;
- контейнер для твердих відходів;
- контейнер для рідких відходів;
- ¹автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- ²одно- або багатоканальний спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 нм.

^{1,2}Будь ласка, проконсультуйтеся з нами щодо адаптації Вашого обладнання.

5. Застереження та техніка безпеки

5.1. Застереження:

– не використовуйте компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;

– не використовуйте під час аналізу та не змішуйте компоненти різних серій та компоненти із тест-систем різних нозологій;

– не використовуйте реактиви інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest®;

- Примітка: Розчин для промивання Tw20 (20x), Розчин для попереднього розведення сироваток, Розчин ТМБ, стоп-реагент допускається використовувати інших серій, які відрізняються від тих, що вкладені до тест-набору. Ці реактиви використовуються в інших тест-системах виробництва ТОВ „ІВК „Рамінтек”. Будь ласка, проконсультуйтеся з нами для отримання детальної інформації.

– після використання реагенту закривайте кожен флакон своєю кришкою;

– чітко дотримуйтеся режиму промивання планшетів, вказаного в пунктах інструкції;

– під час промивання контролюйте наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;

– кожного разу використовуйте новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;

– уникайте потрапляння прямих сонячних променів на реактиви тест-системи;

– розчин ТМБ перед використанням має бути безбарвним або світло блакитним, якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникайте контакту розчину ТМБ з металами або іонами металів. Для роботи використовуйте лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;

- для внесення в лунки планшета ТМБ-субстрату використовуйте лише нові наконечники, що не були у використанні;

– ні в якому разі не використовуйте один й той же посуд для розчину кон'югату та хромогену.

5.2. Техніка безпеки:

– всі реактиви набору призначені лише для in vitro діагностики;

– постановку аналізу проводити лише у гумових рукавичках;

– не піпетувати розчини ротом;

– в калібраторах тест-системи «Vitrotest Rubella-IgG» не виявлено HBsAg та антитіл до ВІЛ ½, ВГС, *Treponema pallidum*, однак працювати із калібраторами та досліджуваними сироватками слід як із потенційно небезпечним інфекційним матеріалом;

– рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6% упродовж 3 годин при кімнатній температурі, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5% протягом 30 хвилин, або іншими дезінфікуючими агентами;

– тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування при 121°C упродовж 1 години;

– не автоклавайте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;

– слід уникати розбризкування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту із слизовими оболонками та шкірою;

– у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню 6%-м перекисом водню, а потім витерти насухо фільтрувальним папером.

6. Зберігання та стабільність

Реагенти тест-системи стабільні протягом строку придатності вказаного на етикетці, якщо їх зберігати при 2-8°C.

Транспортувати набір при температурі 2-8°C. Допускається одноразове транспортування при температурі не вище 20°C протягом двох діб.

7. Підготовка зразків

Зразки сироватки чи плазми крові можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 3 діб після забору. Допускається більш тривале зберігання зразків замороженими при температурі від -20 до -70°C. Заморожені зразки перед використанням розморожують та витримують при кімнатній температурі упродовж 30 хвилин. Після розморожування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникайте повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільняються від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./хв. протягом 10-15 хвилин. Не використовуйте зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

8. Розведення зразків та підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest Rubella-IgG» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.

8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та **зберігайте щільно закритим на замок (zip-lock)** при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Розчин для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

8.3. Попереднє розведення зразків та калібраторів

Досліджувані зразки та калібратори попередньо розведіть у 10 разів розчином для попереднього розведення сироваток. Для цього в необхідну кількість лунок планшета для попереднього розведення сироваток (комплектується в наборі) внесіть по 90 мкл розчину для попереднього розведення сироваток та додайте по 10 мкл сироваток та калібраторів. Під час внесення сироваток та калібраторів обережно піпетуйте суміш, при цьому колір розчину для попереднього розведення сироваток повинен змінитись з коричнево-зеленого на синій.

Процедуру розведення зразків та калібраторів слід проводити безпосередньо перед аналізом.

Сироватки пацієнтів з очікуваною концентрацією специфічних антитіл вище калібратора K100 (100 МО/мл) рекомендуємо дослідити в двох розведеннях 1/100 та 1/1000. Щоб дослідити зразок в розведенні 1/1000 приготуйте попереднє розведення сироватки 1/100, для цього додайте 10 мкл сироватки до 990 мкл розчину для попереднього розведення сироваток.

9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для калібраторів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з калібраторами обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.2.

9.4. Провести попереднє розведення калібраторів та сироваток відповідно до пункту 8.3.

9.5. В лунки стрипів ІФА-планшета внести по 90 мкл розчину для розведення сироваток.

9.6. Внести в лунки ІФА-планшета попередньо розведені калібратори та досліджувані зразки в наступному порядку: в лунку А1 – Калібратор К100, в лунку В1 – Калібратор К50, в лунку С1 – Калібратор К10, в лунку D1 – Калібратор К0. В решту лунок внести по 10 мкл попередньо розведених досліджуваних зразків.

9.7. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.8. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.9. В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.10. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті 9.6.

9.11. «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником: обережно відібрати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 мкл розчину ТМБ в лунки.

9.12. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25°C.

9.13. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

9.14. Виміряти на рідері оптичну густину в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

10. Облік результатів та їх інтерпретація

10.1. Достовірність результатів аналізу:

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

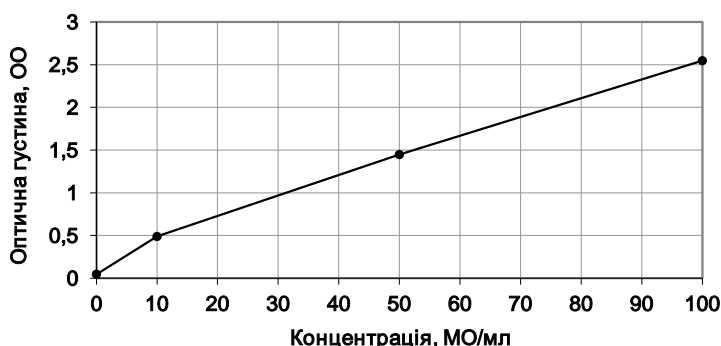
- оптична густина (ОГ) Калібратора К0 не вище 0,2 оптичних одиниць (ОО),
- ОГ Калібратора К10 знаходиться в межах 0,2-0,7 ОО,
- ОГ Калібратора К50 знаходиться в межах 0,9-1,7 ОО,
- ОГ Калібратора К100 - не нижче 1,5 ОО.

10.2. Облік результатів аналізу.

Для отримання кількісних результатів визначення концентрації антитіл класу IgG в МО/мл побудуйте калібрувальний графік: на осі ОУ відкладіть значення ОГ чотирьох калібраторів К0, К10, К50 та К100, а на осі ОХ – відповідні їм концентрації - 0, 10, 50, 100 МО/мл, відповідно.

За допомогою калібрувального графіку визначте концентрацію (МО/мл) специфічних IgG у досліджуваних зразках, яка відповідає значенню отриманої ОГ.

Приклад калібрувального графіку наведено на рисунку.



*Примітка:
не використовуйте
цей графік для
визначення
концентрації
специфічних
IgG у Вашому аналізі.*

Для зразків, що досліджувались у розведенні 1/1000 визначену за графіком концентрацію специфічних антитіл слід перемножити на ступінь розведення, тобто

$$\text{кінцева концентрація} = \text{концентрація за графіком} \times 10$$

Для зручності обліку результатів реакції можна використовувати комп'ютерні програми зчитування та обрахунку результатів досліджень.

10.3. Інтерпретація результатів.

Результати визначення концентрації специфічних IgG в МО/мл інтерпретують наступним чином:

Концентрація	Результат
> 15 МО/мл	позитивний
10-15 МО/мл	невизначений
< 10 МО/мл	негативний

11. Діагностичні характеристики тесту

11.1. Специфічність та чутливість

Специфічність та чутливість тест-системи «Vitrotest Rubella-IgG» оцінювали за допомогою комерційної панелі сироваток виробництва „SeraCare Life Sciences” (США) «Anti-Rubella Mixed Titer Performance Panel PTR201», що складається з 25 охарактеризованих зразків сироваток та плазми. В тест-системі «Vitrotest Rubella-IgG» всі позитивні та негативні зразки визначались коректно, відповідно до паспортних даних.

В порівняльних дослідженнях тест-системи «Vitrotest Rubella-IgG» з іншою комерційною тест-системою, що має СЕ маркування серед 42 негативних та 119 позитивних на анти-Rubella IgG антитіла сироваток спостерігалось 100% співпадіння позитивних та негативних результатів.

11.2. Точність

Відтворюваність результатів в межах однієї постановки аналізу (Intra assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для калібраторів оцінювали в 32 повторях на двох серіях тест-систем, CV₁ та CV₂, відповідно.

Калібратор	CV ₁ , %	CV ₂ , %
K10	4,9	4,5
K50	2,9	3,3
K100	2,7	2,6

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для калібраторів оцінювали протягом трьох днів в трьох постановках аналізу, по 8 повторів в кожному аналізі.

Калібратор	CV, %
K10	6,5
K50	5,7
K100	5,1

12. Обмеження аналізу

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest Rubella-IgG» є свідченням наявності у пацієнта антитіл класу IgG специфічних до вірусу краснухи, які продукуються організмом при інфікуванні вірусом або після вакцинації. Наявність антитіл цього класу у новонароджених не є доказом інфікування вірусом краснухи.

Для диференціації первинної краснушно-ї інфекції та паст-інфекції рекомендується провести дослідження на наявність специфічних антитіл класу IgG у парних сироватках, отриманих з інтервалом забору крові не менш як два тижні, а також провести тестування на наявність специфічних антитіл класу IgM, наприклад, у тест-системі «Vitrotest Rubella-IgM».

Для постановки діагнозу слід враховувати як результати лабораторних досліджень так і клінічні прояви захворювання.

Література

1. Center for Disease Control and Prevention. Rubella and Congenital rubella syndrome: United States, 1994-1997. – MMWR, 1997. – V. 46. – P. 350 – 354.
2. Knox E.G. Theoretical aspects of rubella vaccination // Rev. Infect. Dis. – 1985 – V. 7. – P. 194-197.
3. Tischer A., Gerike E. Immune response after primary ad revaccination with different combined vaccines against measles, mumps, rubella // Vaccine. – 2000. – V. 18 – P. 1382-1392.
4. WHO. Guidelines for surveillance of CRS and Rubella // WHO, 1999. – 92 p.
5. Zimmerman L. Chapter 11: Rubella // VPD Surveillance Manual, 3rd edition. – 2002 – P. 11.1-11.12.

Умовні позначення

Інтерпретація умовних символів:

	«Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i> »
	«Код партії»
	«Номер за каталогом»
	«Дата виготовлення»
	«Використати до»
	«Температурне обмеження»
	«Містить достатньо для (n-) випробувань»
	«Берегти від прямих сонячних променів»
	«Увага, дивись інструкцію з використання»
	«Виробник»
	«Ознайомлення з інструкціями для застосування»

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



Товариство з обмеженою відповідальністю «Іноваційно-виробнича компанія «Рамінтек»
03039 Україна, м. Київ, пр-т 40-річчя Жовтня, 7, оф. 227 (юридична адреса)
07300 м. Вишгород, Київська обл.. вул. Шолуденка, 19 (фактична адреса)
тел. +380 44 222-76-72

Схема проведення аналізу в тест-системі «Vitrotest Rubella-IgG»

Витримати реагенти 30 хв. при 18-25°C

Приготувати розчин для промивання планшета, розвести 20х концентрат розчину для промивання *Tw20* очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води

Заповнити бланк внесення проб для аналізу

Підготувати попереднє (1:10) розведення сироваток: в лунки планшета для попереднього розведення внести по 90 мкл розчину для попереднього розведення зразків (коричнево-зелений) та додати по 10 мкл досліджуваних зразків або калібраторів. Під час внесення досліджуваних зразків змінюється колір розчину в лунках з коричнево-зеленого на синій.

В лунки ІФА-планшета внести по 90 розчину для розведення сироваток (жовтий) та додати по 10 мкл розведених 1:10 зразків та калібраторів:

A1 – калібратор K100, B1 – калібратор K50,

C1 – калібратор K10, D1 – калібратор K0,

E1 та решта лунок – досліджувані зразки

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37 °C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату (фіолетовий)

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату

Інкубувати планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі (18-25°C)

В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту

Виміряти оптичну густину в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм

Побудувати калібрувальну криву, визначити концентрацію МО/мл специфічних до вірусу краснухи антитіл класу IgG в досліджуваних зразках

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці

<i>Концентрація</i>	<i>Результат</i>
> 15 МО/мл	позитивний
10-15МО/мл	невизначений
< 10 МО/мл	негативний