



Vitrotest®

Vitrotest Rubella-IgM ultra

Імуноферментна тест-система
для якісного визначення антитіл класу IgM
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. 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

TK004

**«Vitrotest Rubella-IgM ultra»
Імуноферментна тест-система для якісного визначення
антитіл класу IgM до вірусу краснухи**

1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest Rubella-IgM ultra» призначена для якісного визначення антитіл класу IgM 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 – вірусна інфекційна хвороба, яка характеризується висипаннями на шкірі, генералізованою лімфаденопатією, помірною інтоксикацією та нетривалою лихоманкою. Зазвичай захворювання протікає швидко та у легкій формі. Особливе значення краснухи як інфекційного захворювання пов'язане з небезпекою тяжких ускладнень для дитини, що можуть розвинути при зараженні матері в період вагітності.

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

Після вакцинації, як і при первинному інфікуванні вірусом краснухи, першими в крові з'являються специфічні імуноглобуліни класу IgM; після зараження вони реєструються на 3-5-у добу від появи висипань, а після вакцинації антитіла цього класу починають виявлятися в крові на третьому-четвертому тижні. Специфічні антитіла класу IgG починають продукуватись організмом 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, які також вважаються доказом вродженої краснухи у новонароджених.

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

Виявлення антитіл класу IgM до вірусу краснухи в тест-системі «Vitrotest Rubella-IgM ultra» ґрунтується на принципі «непрямого» твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА).

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованим в лунках очищеним антигеном 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 імуноглобулінів класу IgM людини моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, що зв'язується з імунними комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імунних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). В результаті реакції розчин в лунках, де утворились імунні 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.

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

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

Позитивний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,3 мл розчину специфічних імуноглобулінів (рожевий).

Негативний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,5 мл негативної сироватки крові людини (жовтий).

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 IgM 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 Tween 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 0,5М сірчаної кислоти.

Планшет для попереднього розведення сироваток – 12 стрипів по 8 лунок.

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

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

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 ТМБ та 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 дотримуйтесь 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 має бути безбарвним або світло блакитним перед використанням, 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;
- контролю тест-системи «Vitrotest Rubella-IgM ultra» протестовано та визнано негативними на наявність HBsAg, а також антитіл до ВІЛ 1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однак працювати з контролями та досліджуваними сироватками слід як із потенційно 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, чи іншими дезінфікуючими агентами;
- тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування при 121°C упродовж 1 години;
- не автоклауйте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;
- слід уникати розбрикування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту із слизовими оболонками та шкірою;
- у разі розбрикування 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, за умови зберігання їх 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 слід використовувати зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

8. Підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest Rubella-IgM ultra» 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

Флакони містять 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 є достатнім 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 контролів

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

Процедуру розведення зразків та контролів слід проводити безпосередньо перед аналізом.

9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями 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 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 контролі та досліджувані зразки в наступному порядку: в лунку А1 – 10 мкл попередньо розведеного 1:10 позитивного контролю, в лунки В1, С1 та D1 – по 10 мкл попередньо розведеного 1:10 негативного контролю, в решту лунок – по 10 мкл попередньо розведених 1:10 досліджуваних сироваток. Таким чином, кінцеве розведення сироваток в лунках ІФА-планшета має становити 1:100. Під час внесення розведених сироваток та контролів обережно піпетуйте суміш – відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з жовтого на зелений.

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 9.8.

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:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$ОГ K_{-середнє} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3}) / 3$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

– оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 1,2 оптичних одиниць (ОО),

– ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,15 ОО.

– оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$ОГ K_{-середнє} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{-середнє} \times 2,0$$

Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення K- за рештою значень негативного контролю.

10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,30, тобто

$$Граничне значення = ОГ K_{-середнє} + 0,30$$

Для кожного досліджуваного зразка розрахувати індекс позитивності (ІП)

$$ІП = \frac{ОГ досліджуваного зразка}{граничне значення}$$

10.3. Інтерпретація результатів.

Зразки із значенням індексу позитивності вище 1,1 є **позитивними (ІП > 1,1)**.

Негативними є досліджувані сироватки із значенням ІП нижче 0,9 (**ІП < 0,9**)

Досліджувані зразки із значенням ІП в межах 0,9-1,1 вважати **невизначеними (0,9 ≤ ІП ≤ 1,1)**. Такі сироватки рекомендується дослідити повторно в двох лунках тест-системи. Якщо результати знову будуть в межах невизначених, слід провести тестування сироватки, отриманої через 2-4 тижні. В разі отримання невизначених результатів вважати такі зразки негативними.

11. Діагностичні характеристики тесту

11.1. Специфічність та чутливість

Специфічність та чутливість тест-системи «Vitrotest Rubella-IgM ultra» оцінювали на комерційній панелі сироваток виробництва „SeraCare Life Sciences” (США) «Anti-Rubella Mixed Titer Performance Panel PTR201», до складу якої входять 5 зразків, що містять антитіла класу IgM до вірусу краснухи та 20 сироваток, які не містять IgM специфічних антитіл. Всі зразки панелі PTR 201 в тест-системі «Vitrotest Rubella-IgM ultra» визначались коректно, відповідно до паспортних даних. При дослідженні специфічності тест-набору «Vitrotest Rubella-IgM ultra» з використанням 154 сироваток, негативних на антитіла до вірусу краснухи, всі 154 зразки були виявлені негативними.

В порівняльних дослідженнях тест-системи «Vitrotest Rubella-IgM ultra» з іншою комерційною тест-системою, що має CE маркування, було проаналізовано 12 сироваток, що містять антитіла класу IgM до вірусу краснухи (в тому числі

чотири сироватки отримані від вакцинованих осіб на 24-28 день після щеплення) - всі ці зразки були виявлені позитивними в обох тест-системах.

11.2. Точність

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

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали в 32 повторях на двох серіях тест-систем.

№ сироватки	ОГ середня	CV ₁ , %	CV ₂ , %
S10	0,898	7,4	5,9
S7	1,732	6,5	5,8

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали протягом трьох днів в трьох постановках аналізу, по 8 повторів в кожному аналізі.

№ сироватки	ОГ середня	CV, %
S10	0,931	7,1
S7	1,820	5,2

12. Обмеження аналізу

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest Rubella-IgM ultra» є свідченням наявності у пацієнта антитіл класу IgM, специфічних до вірусу краснухи.

Антитіла класу IgM присутні в крові в період гострої краснушної інфекції у дітей та дорослих, незалежно від ступеня вираженості клінічних проявів, а також у новонароджених дітей при вродженій краснушній інфекції.

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

З метою нівелювання хибнопозитивних результатів, спричинених наявністю в зразках сироваток крові людини аутоантитіл, специфічних до імуноглобулінів класу G (ревматоїдного фактору), в тест-системі використовується спеціальний блок-компонент, що перешкоджає формуванню імунних комплексів з анти-людськими антитілами на твердій фазі.

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-IgM ultra»

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 контролів. Під час внесення досліджуваних зразків змінюється колір розчину в лунках з коричнево-зеленого на синій.

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

A1 – позитивний контроль, B1, C1, D1 – негативний контроль,
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 густина в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм

Розрахувати граничне значення (ГЗ) в тест-системі «Vitrotest Rubella-IgM ultra» за формулою
$$ГЗ = ОГ K_{\text{середнє}} + 0,30$$

Розрахувати індекс позитивності (ІП) для досліджуваних зразків:
$$ІП = \frac{ОГ \text{ досліджуваного зразка}}{\text{граничне значення}}$$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці

Значення ІП	Результат
$ІП_{\text{зразка}} > 1,1$	позитивний
$0,9 \leq ІП_{\text{зразка}} \leq 1,1$	невизначений
$ІП_{\text{зразка}} < 0,9$	негативний