



**Инструкция
пользователя**



**РЕСПИРАТОРНЫЙ
СИНЦИТИАЛЬНЫЙ ВИРУС (РСВ)
IgM ИФА**

REF

EIA-3508



96 лунок

Внимание!!!

По независящим от нас причинам, в тексте данного перевода возможны несоответствия с действительной версией инструкции пользователя. Во избежание искажения результатов анализа настоятельно рекомендуется сверять данный перевод с инструкцией, вложенной в набор, уделяя особое внимание составу набора и процедуре постановки.

1 ВВЕДЕНИЕ

1.1 Наименование и назначение

Набор **Респираторный синцитиальный вирус IgM ИФА (Respiratory Syncytial Virus IgM ELISA)** – набор для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM к РСВ в сыворотке человека.

Только для диагностики in vitro.

1.2 Описание и объяснение теста

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является оболочечным РНК-содержащим вирусом. Вирион бывает разный по форме и размеру (в среднем диаметр между 120 и 300 нм), является неустойчивым в окружающей среде и легко инактивируется. Респираторный синцитиальный вирус является наиболее распространенной инфекцией дыхательных путей. Она обычно появляется во время вспышек заболеваний населения в период поздней осени, зимы или ранних весенних месяцев. Сроки и тяжесть заболевания вирусом в сообществе меняться из года в год.

Большинство младенцев заражаются РСВ во время первого эпидемического сезона; 25% - 40% из них имеют признаки или симптомы бронхоолита или пневмонии, а 0,5% - 2% нуждаются в госпитализации. Многие дети выздоравливают через 8 -15 дней. Большинство, госпитализированных с РСВ инфекцией, - младенцы до 6-месяцев. В образцах сыворотки детей в возрасте 2 лет возможно получить обнаружить РСВ.

РСВ также вызывает повторные инфекции на протяжении всей жизни, как правило, напоминающие средние-тяжелые формы простудных заболеваний. Однако тяжелые заболевания нижних дыхательных путей могут возникнуть в любом возрасте, но особенно у пожилых людей или у тех из них, у кого есть проблемы с сердцем, легкими или иммунной системой.

2 ПРИНЦИП АНАЛИЗА

ДРГ РСВ (RSV) IgM – это твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

Образцы пациента разбавляются раствором для разведения образцов и инкубируются с Сорбентом IgG, содержащим гипериммунные Ат к IgG человека, для того, чтобы устранить конкурентное подавление специфическими IgG и ревматоидный фактор. Такая обработка образцов предотвратит ложноположительный или ложноотрицательный результат.

Микротитровальные стрипованные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигенами к РСВ. **Разведенные образцы** пациента и **готовые к использованию контроли** пипетируются в лунки. Во время инкубации специфические к РСВ антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляется конъюгат антител IgM человека с меткой пероксидазы хрена. Во время второй инкубации этот конъюгат связывается специфически с антителами IgM, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями.

После второй промывки (для удаления несвязанного конъюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции.

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgM специфических к РСВ. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA - ридере.

3 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Данный набор предназначен только для *in vitro* диагностики и профессионального использования.
2. Все реагенты этого набора, которые содержат сыворотку или плазму человека, были протестированы и показали отрицательный результат на HIV I/II, HBsAg и HCV по методам одобренным FDA. Однако не существует методов, гарантирующих полное отсутствие этих веществ. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально опасными.
3. Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно. Используйте действительную версию инструкции, приложенную к набору. Убедитесь, что вам все понятно.
4. Микротитровальная плашка содержит делимые стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2 °C - 8 °C в пакете из фольги и использоваться с поставляемой рамкой.
5. Пипетирование образцов и реагентов должно осуществляться как можно быстрее и с одинаковыми временными интервалами.
6. Используйте резервуары только для одного компонента. Это особенно важно для резервуаров с субстратом. Использование для разлива субстрата емкости, которая прежде использовалась для раствора конъюгата, может привести к изменению цвета раствора. Не сливайте реагенты обратно во флаконы, т.к. это может привести к контаминации реагентов.
7. Для получения достоверных результатов тщательно перемешивайте содержимое лунок. Не используйте лунки повторно.
8. Не позволяйте лункам высохнуть во время анализа; добавьте реагенты сразу после промывки.
9. Перед анализом доведите все компоненты до комнатной температуры (21-26°C). Температура влияет на показания абсорбции. Тем не менее, не будет влияния на образцы пациентов.
10. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
11. Нельзя есть, пить, курить или наносить косметику в месте работы с реагентами.
12. Надевайте одноразовые перчатки при раскапывании образцов и реагентов.
13. Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с процедурами, утвержденными соответствующим управлением биологической безопасности и регулирования.
14. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
15. Все указанные объемы должны соблюдаться в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты возможны только при использовании калибровочных пипеток и микропланшетного ридера.
16. Не смешивайте и не используйте компоненты из различных лотов. Рекомендуется не менять лунки разных плашек даже одного лота. Наборы могут транспортироваться или храниться в разных условиях и в результате характеристики связывания у плашек могут отличаться.
17. Избегайте контакта со стоп раствором – 0.5M H₂SO₄; 1M HCL. Это может вызвать раздражения кожи или ожоги.
18. Некоторые реагенты содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ в качестве консервантов. В случае их контакта с глазами или кожей, промойте этот участок водой.
19. Раствор субстрата ТМБ оказывает раздражающий эффект на коже и слизистых. В случае контакта, промойте глаза с большим объемом воды и кожу с мылом и большим количеством воды. Промойте загрязненные объекты перед повторным использованием. В случае вдыхания реагентов, выведите человека на свежий воздух.
20. Химикаты и готовые и использованные реагенты должны быть утилизированы как биологически опасные в соответствии с региональными нормами.
21. Информацию об опасных реагентах, используемых в этом наборе, вы можете найти в Паспорте безопасности. Он также доступен по запросу в ДРГ.

4 РЕАГЕНТЫ

4.1 Содержимое набора

Микротитровальный планшет, 12 x 8 (делимые) стрипов, 96 лунок;
лунки, покрытые антигенами РСВ.

(включая 1 держатель для стрипов и 1 пленка для заклеивания стрипов)

Раствор для разведения образцов *, 1 флакон, 100 мл, готов к использованию,
Желтого цвета, рН 7.2 ± 0.2.

IgG-RF-Сорбент*, 1 флакон, 6.5 мл, готов к использованию,
желтого цвета, содержит анти-человеческие IgG антитела.

Положительный контроль*, 1 флакон, 2.0 мл, готов к использованию, желтого цвета, красная крышка.

Отрицательный контроль*, 1 флакон, 2.0 мл, готов к использованию, желтого цвета, желтая крышка.

Cut-off контроль*, 1 флакон, 2.0 мл, готов к использованию, окрашен желтым, черная крышка.

Ферментный конъюгат*, 1 флакон, 20 мл, готов к использованию, окрашен красным.

антитела к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Раствор субстрата, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, тетраметилбензидин (ТМВ).

Стоп-раствор, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию,

содержит 0.2 моль/л H₂SO₄,

Избегать контакта со стоп-раствором. Может вызвать ожоги и раздражение кожи.

Промывочный раствор*, 1 флакон, 30 мл (20X концентрированный для 600 мл), pH 6.5 ± 0.1 см. «Приготовление реагентов»

** Содержит безртутный консервант*

4.1.1 Необходимые материалы, не входящие в набор

- Ридер для микротитровальных панелей (450±10 нм)
- Прецизионные микропипетки со съемными наконечниками
- Инкубатор 37 °C
- Устройство для промывки лунок (ручное, полуавтоматическое или автоматическое)
- Вортекс
- Вода (Дистиллированная, деионизированная)
- Таймер
- Абсорбирующая бумага

4.2 Хранение и стабильность реагентов.

При хранении при 2° ÷ 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. Не использовать реагенты по истечении срока годности.

Открытые реагенты хранить при 2° ÷ 8°C. Микротитровальные лунки хранить при 2° ÷ 8°C. После использования части лунок необходимо хранить оставшиеся лунки в герметично закрытой упаковке. Иммунореактивность лунок сохраняется припл. 2 месяца в плотно закрытой упаковке с влагопоглотителем.

4.3 Приготовление реагентов

Перед использованием доведите все реагенты и необходимое количество стрипов до комнатной температуры.

Рабочий промывочный раствор

Развести промывочный раствор **1+19** (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистиллированной водой, pH - 7.2 ± 0.2.

потребление: ~ 5 мл на определение.

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °C на водяной бане.

Убедитесь, что кристаллы полностью растворились.

Стабильность после разведения: 4 недели при 2 ÷ 8 °C

4.4 Утилизация набора

Утилизация набора должна проводиться в соответствии с национальными регламентами. Специальная информация есть в Паспорте Безопасности.

4.5 Повреждение Набора

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, ДРГ должно быть проинформировано в письменной форме, самое позднее в течение 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не могут быть использованы в постановках. Они должны храниться в холодильнике до финального решения. После этого они должны быть утилизированы в соответствии с официальными нормами.

5 ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

В этом исследовании может использоваться сыворотка.

Не использовать сильно гемолизированные, гиперлипидные и мутные образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь венопункцией, дайте свернуться и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания крови. У образцов пациентов с антикоагулянтной терапией на свертывание может потребоваться больше времени.

5.2 Хранение и подготовка образцов

Образцы могут храниться до 24 часов при 2 – 8 °C перед исследованием.

В случае более длительного промежутка времени до исследования образцы должны храниться при -20°C. Перед исследованием размороженные образцы следует несколько раз перевернуть. Избегайте повторного замораживания / размораживания.

5.3 Разведение образцов

Перед использованием образцов пациента, сначала нужно развести их с раствором для разведения образцов. Для поглощения ревматоидного фактора эти предварительно разбавленные образцы следует инкубировать с IgG-RF-сорбентом.

1. Развести каждый образец пациента **1+50** раствором для разведения образцов.
Например, 10 мкл образца + 0.5 мл раствора для разведения образцов. **Хорошо перемешать**
2. Развести предварительно разбавленные образцы **1+1** с IgG-RF Сорбентом. **Хорошо перемешать**.
Например, 60 мкл предварительно разбавленных образцов + 60 мкл IgG-RF сорбента.
3. **Дать настояться 15 минут при комнатной температуре, хорошо перемешать или настаивать всю ночь при температуре 2°C – 8°C и хорошо перемешать.**
5. Взять **100 мкл** этих предварительно обработанных образцов для ИФА анализа.

Внимание: Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять!

6 ПРОЦЕДУРА ИФА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- **Все реагенты и образцы, контроли должны быть комнатной температуры перед началом анализа.**

- После начала процедуры, все шаги должны быть проведены без остановки.

- Используйте новые пластиковые насадки для дозатора для каждого стандарта, контроля и образца для предотвращения контаминации.

- Поглощение - функция времени инкубации и температуры. Перед началом анализа рекомендуется подготовить все реагенты, снять все крышки и закрепить необходимое количество стрипов в держателе. Это позволит придерживаться одинакового времени между пипетированием.

- Как обычно ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

- Плотнo закрывайте флаконы с реагентами после использования, чтобы избежать испарения и бактериального заражения.

- Во избежание перекрестного загрязнения и завышенных результатов необходимо аккуратно пипетировать образцы пациентов и вносить конъюгат без расплескивания, на дно лунок.

- Во время инкубации накрывать микротитровальные лунки пленкой, чтобы не допустить испарения.

6.2 Процедура анализа

1. Перед проведением анализа приготовьте рабочий промывочный раствор, **разведите образцы, как указано в пункте 5.3**, хорошо перемешайте перед пипетированием и внимательно составьте схему распределения и идентификации образцов, стандартов и контролей с помощью формы вложенной в набор.

1. Отобрать требуемое количество микротитровальных стрипов или лунок и поместить их в держатель. Разместите по меньшей мере:

1 лунка	(напр., A1)	для бланка субстрата,
1 лунка	(напр., B1)	для отрицательного контроля
2 лунки	(напр., C1+D1)	для cut-off контроля
1 лунка	(напр., E1)	для положительного контроля.

На усмотрения пользователя контроли и образцы пациентов можно исследовать в дублях.

2. Внести

100 мкл отриц.контроля в лунку B1,

100 мкл cut-off контроля в лунки C1 и D1,

100 мкл полож. контроля в лунку E1,

100 мкл каждого разведенного образца в оставшиеся лунки согласно схеме распределения, используя новые наконечники для каждого образца.

Оставить лунку A1 для бланка субстрата!

3. Накрыть лунки пленкой, поставляемой в наборе. Инкубировать **60 мин при 37°C**.

4. Удалить содержимое лунок и промыть их **5 раз (300 мкл на лунку)** рабочего промывочного раствора. Вытряхнуть остатки влаги на абсорбирующую бумагу.

Примечание: Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.

5. Внести по **100 мкл** конъюгата во все лунки, **кроме A1**.

6. Инкубировать **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °C)**.

Не подвергать воздействию прямого солнечного света!

7. Повторить процедуру промывки, как описано в этапе 4.

Примечание: осторожно удалить остатки жидкости, выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!

8. Внести по **100 мкл** раствора субстрата во все лунки.

9. Инкубировать ровно **15 минут при комнатной температуре (20 ÷ 25 °C) в темноте**.

10. Внести по **100 мкл** стоп-раствора во все лунки.

Любое голубое окрашивание, проявившееся во время инкубации, переходит в желтое.

Примечание: высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!

11. Прочитайте ОП при **450/620 нм** с помощью ридера **в течение 30 минут** после добавления стоп-раствора.

6.3 Подсчет результатов

Настроить микропланшетный ридер для ELISA на нуль, используя **бланк субстрата в лунке A1**.

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на нуль, используя бланк субстрат в лунке A1, вычитайте значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции.

Измерить абсорбцию во всех лунках при 450 нм и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в схему.

Двойная длина волны – рекомендуется считывать на 620 нм как референтной длине волны. Где применимо **рассчитать среднее значение абсорбции** всех дублей.

7 РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Правильность постановки

Постановка прошла успешно, если:

Бланк субстрата в A1:	абсорбция ниже 0.100
Отр. Контроль в B1:	абсорбция ниже 0.200
Cut-off контроль C1/D1:	абсорбция между 0.350 – 0.850
Полож.контроль в E1:	абсорбция выше 0.650-3.000

7.2 Расчет

Среднее значение cut-off контроля [CO]

Cut-off - это среднее значение ОП от 2 измеренных Cut-off контролей (например C1/D1).

Пример: $(0.44 + 0.46) : 2 = 0.45 = CO$

7.3 Интерпретация

ПОЛОЖИТЕЛЬНО (Средние) значения абсорбции пациентов более чем на 10 % больше **CO**
(Среднее ОП пациента $> 1.1 \times CO$)

СЕРАЯ ЗОНА (Средние) значения абсорбции пациентов от 10 % выше до 10 % ниже **CO**
повторить анализ через 2-4 недели с новым образцом пациента.
($0.9 \times CO \leq \text{Среднее ОП пациента} \leq 1.1 \times CO$)

Результаты второго анализа, вновь оказавшиеся в серой зоне – **отрицательные**.

ОТРИЦАТЕЛЬНО (Средние) значения абсорбции пациентов более чем на 10 % меньше **CO**
(Средняя ОП пациента $< 0.9 \times CO$)

7.3.1 Результаты в единицах ДРГ (DU)

$\frac{\text{Сред. значения абсорбции пациента} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{ДРГ единицы} = \text{DU}]$

Пример: $\frac{1.580 \times 10}{0.45} = 35 \text{ DU}$

Интерпретация

Cut-off:	10	DU
Серая зона:	9 - 11	DU
Отрицательно:	< 9	DU
Положительно:	> 11	DU

8 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с местными нормами. Использование контрольных образцов необходимо для ежедневной проверки валидности результатов. Используйте контроли как нормальные, так и патологические.

Если результаты анализа не укладываются в приемлемый диапазон, полученный с помощью контролей, то результаты признаются недействительными.

В этом случае проверьте следующее: пипетирование и время работы анализатора, фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирация и промывка.

В случае отсутствия ошибок при проверке обратитесь в ДРГ напрямую.

9 ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяется, как вероятность анализа дать отрицательный результат в отсутствие специфического анализата. Данные обрабатываются.

9.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - возможность тест-системы показать положительный результат в присутствии специфического анализата. Данные обрабатываются..

10 ОГРАНИЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Бактериальное загрязнение или многократное замораживание/оттаивание образцов могут повлиять на значения абсорбции. Результаты пациентов с ослабленным иммунитетом, а так же новорожденных имеют ограниченное диагностическое значение.

11 ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен быть выполнен в соответствии с инструкциями изготовителя по применению. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правила GLP (хорошей лабораторной практики) или других применимых национальных стандартов и / или законов. Это особенно актуально для использования контрольных реагентов. Важно всегда включать, в рамках проведения анализа, достаточное количество контролей для проверки достоверности и точности теста.

Результаты действительны, только если все контроли находятся в пределах заданного диапазона, и, если все остальные параметры теста, также в рамках данных характеристик анализа. В случае каких-либо сомнений, пожалуйста, свяжитесь с ДРГ.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения никогда не должны быть основаны только на результатах лабораторных анализов, даже если результаты всех тестов находятся в согласии, как указано в пункте 11.1. Любой лабораторный результат только часть общей клинической картины пациента.

Только в тех случаях, когда результаты лабораторных исследований соответствуют общей клинической картине, может быть сделано терапевтическое заключение.

Результат теста никогда не должен быть единственным определяющим фактором для получения любого терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и / или обмен или замена каких-либо компонентов разных партий из одного набора на другой может негативно сказаться на ожидаемых результатах и обоснованности анализа вообще. В случае таких изменений и / или замен любое требование о замене набора недействительно. Претензии, поданные в связи с неверной интерпретацией результатов анализа клиентом, в соответствии с пунктом 11.2. также недействительны.

Несмотря на это, в случае каких-либо претензий, ответственности производителя не должна превышать стоимость набора. Вред, причиненный набору при транспортировке, не подлежит ответственности производителя.

12 ЛИТЕРАТУРА

1. Wiegand, R.: Respiratory Syncytial Virus (RSV). In: Brandis, H., W. Köhler, H. J. Eggers, G. Pulverer (ed.): Med. Mikrobiologie 1994. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York (1994) 767-769
2. Hall, C. B., et al.: Immunity to and frequency of reinfection with Respiratory Syncytial Virus. J. Infect. Dis. 163 (1991) 693-698
3. Hohlberg, C. J., et al.: Risk factors for Respiratory Syncytial Virus associated lower respiratory illness in the year of life. Am. J. Epidemiol. 133 (1991) 1135-1151