



Иммуноферментный набор для определения avidности IgG антител анти-КРАСНУХИ в человеческой сыворотке или плазме

Кат. № : K2RGA
Количество тестов: 45
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 02-2006
Версия 8

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОЛЬКО В ДИАГНОСТИКЕ IN VITRO

1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Краснуха является тогавирусом РНК сферической формы, 60 нм в диаметре. Краснуха зачастую причиняет легкое недомогание, делая пациента полностью избавляя его от защиты иммунитета. Однако, при заражении во время беременности, болезнь может в значительной мере повлиять на плод, особенно в первый триместр беременности. Повреждения сердечно-сосудистой системы, глухота, хориоретинит, задержка умственного развития и роста – некоторые из поврежденных плода, вызванные вирусом.

Значительное количество женщин (около 10-20%) не подававшихся вакцинации, достигнут зрелого возраста без приобретения иммунитета против вируса краснухи. Поэтому диагностика инфекции краснухи в беременных женщин на ее острой стадии крайне важна. Как правило она проводится путем анализа наличия антител класса IgM. Тем не менее, определение острой фазы болезни на основании единого образца может оказаться сложным или вопреки влиянию IgM (часто затянущемуся) или еще вопреки наличия IgM в случаях асимптоматической инфекции, которая не является угрозой для плода. Измерение avidности специфичного IgG оказалось крайне полезным в определении первичной инфекции. Как правило, первичная реакция IgG антитела на инфекцию характеризуется антителами с низкой avidностью, при которой связывание со областями специфичного антигена легко диссоциируется.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Этот набор основан на методе иммуноферментного анализа (ELISA), в котором сыворотке пациента реагирует в дубликате с антигеном краснухи, покрытым на микропланшете. После первой инкубации, сопровождаемой промывкой микропланшета, лунки репликаторов инкубируются, каждая с отдельным буферным раствором, один из которых содержит мочевины. Реагент мочевины причиняет диссоциацию предварительно сформированного связывания антитела-антигена. Степень диссоциации зависит от avidности данного антитела. Далее, после этапа промывки, антитела, которые все еще связаны с твердой фазой, появляются в последующих реакциях, сначала с анти-человеческим IgG антителом (конъюгированным с пероксидазой хрена) и затем с раствором хромогена (тетраметилбензидина, ТМБ) в субстратном буфере. Колориметрическое считывание будет проводиться с использованием спектрофотометра при 450 и 405 нм. Затем рассчитывается соотношение между оптическими плотностями двух лунок и выражается как процент avidности.

3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок, что соответствует 45 анализам.
- хранить набор при 2-8°C.
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 2 месяцев.

3.1 Специфичные реагенты

- **Покрытый микропланшет:** 1 планшет на 96 делимых лунок покрытых оцищенным и инактивированным вирусным антигеном краснухи. Держите неиспользованные лунки при 2-8°C в поставляемом полиэтиленовом пакете (контейнере микропланшета) и тщательно закрытым.

- **Контроль низкой avidности:** 1 флакон основы сыворотки с анти-краснухой IgG человека низкой avidности. Лиофилизированный, красного цвета. Консервант: NaN_3 (<0.1%). Перед использованием разбавить содержимое флакона 2 мл дистиллированной воды. После разбавления хранить при 2-8°C в течении 2 месяцев; при более длительном хранении заморозить до -20°C.
- **Контроль высокой avidности:** 1 флакон основы сыворотки с анти-краснухой IgG человека высокой avidности. Лиофилизированный, синего цвета. Консервант: NaN_3 (<0.1%). Перед использованием разбавить содержимое флакона 2 мл дистиллированной воды. После разбавления хранить при 2-8°C в течении 2 месяцев; при более длительном хранении заморозить до -20°C.
- **Диссоциирующий реагент:** 1 флакон (10 мл) мочевины в буферном растворе. Готов к использованию.
- **Ферментный конъюгат:** 1 флакон (14 мл) мышиноного моноклонального анти-человеческого IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена в основе сыворотки со стабилизаторами. Розового цвета, готов к использованию. Консервант: неомидин.

3.2 Общие реагенты для наборов панелей T.O.R.C.H –S.T.D. и детских болезней

- **Промывочный раствор (концентрированный):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween 20. Консервант: тимеросал (< 0.05 %). Непосредственно перед использованием, разбавьте необходимое количество 1:20 дистиллированной водой. Хранить разбавленный промывочный раствор в течение 30 дней при 2-8°C. В случае нерастворенных кристаллов, заново восстановите раствор, оставив флакон на несколько минут при 37°C.
- **Разбавитель образца:** 1 флакон (20 мл) основы сыворотки со стабилизаторами, красного цвета. Консервант: NaN_3 (< 0.1%). Непосредственно перед использованием, разбавьте необходимое количество 1:20 предварительно разбавленным промывочным раствором. Хранить разбавленный разбавитель образца в течение 30 дней при 2-8°C.
- **Хромоген ТМБ:** 2 флакона (по 15 мл) тетраметилбензидина с цитратно-фосфатным буфером DMSO и H_2O_2 . Готов к использованию.
- **Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H_2SO_4 . Готов к использованию.
- **Липкие пленки для планшета.**
- **Полиэтиленовый пакет.**

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Инкубатор, настроенный на 37+/-2 °C.
- Мерные колбы для разбавления образцов.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр для измерения абсорбций с интервалом 0-3,0 А при 450 и 405 нм.
- Миллиметровая графическая бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ЗАМЕЧАНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфичные реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.

- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуйте:
 - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
 - периодам инкубации и температуре, это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходит регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелюбопытная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может причинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пейте, не курите, не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Используемые для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава

следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.

- Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Во избежание накопления взрывоопасных азидов металла в медных и свинцовых трубопроводах реагенты необходимо удалять путем промывания водосточной трубы большим количеством воды.

6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоколипемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Образцы плазмы могут содержать волокнистые вещества, которые могут повлиять на анализ; перед анализом убедитесь, что образцы всегда идеально чистые. Храните образцы при 2-8°C в течении 1-2 дней. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы до -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов.

Перед использованием разбавьте образцы 1:300 разведенным разбавителем образца (см. РЕАГЕНТЫ).

Пример: 10 мкл образца + 2990 мкл разведенного разбавителя образца).

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Позвольте реагентам и образцам нагреться до комнатной температуры.

- Переворачивая образцы, смешайте их перед использованием.

- 7.1 Приготовьте лунки в двойном экземпляре для: бланка, контроля низкой avidности, контроля высокой avidности и образцов.
- 7.2 Внесите **100 мкл** контроля низкой avidности в лунки C1 и D1; **100 мкл** контроля высокой avidности в лунки E1 и F1; **100 мкл** первого (разбавленного) образца в лунки G1 и H1; аналогично продолжайте со всеми другими образцами.
- 7.3 Накройте микропланшет самоклеющейся крышкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **60+/-5 минут при 37+/-2°C**.
- 7.4 Соберите инкубационную смесь и промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
- 7.5 Внесите **100 мкл** разбавителя образца в непарные лунки (A1, C1, E1, G1 и т.д.) и **100 мкл** диссоциирующего реагента в парные лунки (B1, D1, F1, H1 и т.д.).
- 7.6 Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **30+/-2 минут при 37+/-2°C**.
- 7.7 Соберите жидкость и промойте лунки как описано в п 7.4.
- 7.8 Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки.
- 7.9 Накройте микропланшет самоклеющейся крышкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **30+/-2 минут при 37+/-2°C**.
- 7.10 Соберите жидкость и промойте лунки как описано в п. 7.4.
- 7.11 Внесите **100 мкл** хромогена во все лунки.
- 7.12 Инкубируйте лунки в течении **10 минут при 37+/-2°C**.
- 7.13 Внесите **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
- 7.14 Считайте абсорбцию лунок желательно с помощью биохимического спектрофотометра при **450 нм** с контрольной длиной волны 620 нм (настроив аппарат на 0 с лункой бланка). В случае избытка значений абсорбции считайте при 405 нм. Считывание должно быть завершено в течении **15 минут** после завершения анализа.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 4 данной инструкции).

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ*

9.a Отнимите значение бланка (средняя ОП лунок A1 и B1) от значений всех остальных лунок.

9.b При использовании каждого образца убедитесь, что ОП лунок инкубируемых с разбавителем образца - > 0,300. Если так, можете продолжать. Если нет, образец не достаточно концентрирован для оценки avidности IgG (пациенты отрицательны к инфекции краснухи или пациенты инфицированы, но реакция антител пока что слишком слабая).

9.c Для каждого образца и контроля вычислите процентное соотношение между ОП лунки, обработанной диссоциирующим реагентом и ОП лунки, обработанной разбавителем образца. Это соотношение будет составлять процент avidности образца/контроля.

$$\frac{\text{ОП с диссоц. реагентом}}{\text{ОП с разбавителем образца}} \times 100 = \% \text{ avidности}$$

9.d Образцы с ОП >3.000 при 450 нм в любой лунке необходимо считать при 405 нм. В таких случаях необходимо вычислить процент avidности, основываясь на считывании в п. 9.с.

*Используя автоматический аппарат для микропланшетов RADIM и/или SEAC, спектрофотометрическое считывание будет выполняться автоматически при 3 различных волнах длины: 450, 405 и 620 нм, таким образом, позволяя расширить диапазон кривой.

9.1 Пример вычисления

Образец	ОП с разбавит. образца	ОП с диссоц. реагентом	% avidности
Контр. низк. avidности	0,953	0,086	9,0
Контр. высок. avidности	1,470	1,256	85,4
Образец	0,610	0,105	17,2

9.2 Критерии достоверности

ОП при 450 нм контроля и низкой и высокой avidности в лунках, обработанных разбавителем образца должна быть более чем 0,400. Процент avidности (вычисленный выше) должен быть меньше 50% для контроля низкой avidности и более 60% для контроля высокой avidности. В любом случае, результаты должны основываться на клинической оценке и дальнейших диагностических исследованиях.

9.3 Интерпретация результатов

% avidности > 60% =	IgG анти-краснухи с высокой avidностью
% avidности 50-60% =	IgG анти-краснухи со средней avidностью (серая зона)
% avidности < 50% =	IgG анти-краснухи с низкой avidностью

10. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНАЛИЗА

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность метода была оценена на группе из 100 образцов с прошлой или вторичной инфекцией. Результат составил 100%.

10.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность метода была оценена на группе 56 образцов с первичной инфекцией. Результат составил 87,8 %.

10.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность может быть определена как способность анализа точно обнаруживать определенный аналит в присутствии потенциально влияющих факторов в основе образца. Контролируемые изучения потенциально влияющих веществ показали, что на эффективность анализа не воздействуют антикоагулянты (ЭДТА и гепарин).

10.5 Точность

Точность была оценена на приборе Radim, определяющем повторяемость и воспроизводимость анализа (вариативность в пределах и между анализами) на 3 сыворотках при разном % avidности.

Повторяемость (в пределах анализа)

Сыворотка	Средн.	± (Avidность, %)	CO	KB	Репликации, к-во
a	96	±	2	2,5	10
b	72	±	4	5,2	10
c	17,1	±	1,3	7,5	10

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн.	± (Avidность, %)	CO	KB	Репликации, к-во
d	95,5	±	4,7	4,9	10
e	74,9	±	9,94	13,36	10
f	17,53	±	2,17	12,36	10

11. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результат с высокой avidностью не исключает возможности недавней инфекции. С другой стороны, при высокой специфичности анализа положительный результат строго указывает на инфекцию в течении предыдущих 3 месяцев.

8. СХЕМА АНАЛИЗА

Предварительное разбавление образца: 1:300

Лунки Реаг.	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
К. низк. avidности	—	—	100 мкл	100 мкл	—	—	—	—
К. высок. avidности	—	—	—	—	100 мкл	100 мкл	—	—
Образец	—	—	—	—	—	—	100 мкл	100 мкл

- Инкубировать: 37±2°C, 60±5 мин.
- Аспирировать и промыть: 4 x 350 мкл

Разбав. образца	100 мкл	—	100 мкл	—	100 мкл	—	100 мкл	—
Диссоц. реагент	—	100 мкл	—	100 мкл	—	100 мкл	—	100 мкл

- Инкубировать: 37±2°C, 30±2 мин.
- Аспирировать и промыть: 4 x 350 мкл

Конъюгат	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубировать: 37±2°C, 30±2 мин.
- Аспирировать и промыть: 4 x 350 мкл

Хромоген ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Инкубировать: 37±2°C, 10 мин.

Блок. реагент	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
---------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

- Считать: 450-405 нм.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com