



**ФБУН НИИ
эпидемиологии и
микробиологии имени
Пастера
Отдел Новых Технологий**

«УТВЕРЖДАЮ»
Главный государствен-
ный санитарный врач
Российской Федерации
Г.Г.ОНИЩЕНКО
22.04.2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ Набора реагентов Диагностикум эритроцитарный коревой антигенный сухой для реакции пассивной гемагглютинации (РПГА), комплект №2 КЭД-90

**Регистрационное удостоверение
№ФСР 2009/06287 от 15.08.2011 г.**

Диагностикум эритроцитарный коревой антигенный сухой для реакции пассивной геагглютинации (РПГА) представляет собой 3 % акролеинизированные, танализованные бараньи эритроциты, сенсibiliзирoванные дезинтегрированным коревым антигеном.

В состав набора входит:

- диагностикум эритроцитарный коревой (КЭД) антигенный сухой 3%, – 5 фл. по 2 мл;
- сыворотка кроличья нормальная (НКС) сухая 10%, – 5 фл. по 2 мл;
- эритроциты барана, акролеинизированные или формалинизированные несенсибилизированные (суспензия 30%), – 1 фл. 3 мл;
- иммуноглобулин человека нормальный жидкий – положительный контрольный образец коревых антител с титром антител 1:320–1:1280, соответствующим 50 МЕ/мл – 1 амп. 1,5 мл.

Указанные реагенты упакованы в картонную коробку вместе с инструкцией по применению.

Один набор рассчитан для исследования 90 сывороток, не считая контролей.

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление антител к вирусу кори в сыворотках крови людей и в препаратах иммуноглобулина человека.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Диагностикум применяют в реакции пассивной геагглютинации.

Для постановки реакции дополнительно требуются следующие материалы и оборудование:

- дистиллированная вода;
- раствор натрия хлорида, 0,9%, pH 6,6 - 7,2;
- спирт этиловый ректифицированный технический;
- пипетки одноканальные для подачи жидкостей на 5-40 мкл, 40-200 мкл, 200-1000 мкл и 1000-5000 мкл;
- пипетки 8- или 12-канальные для подачи жидкостей на 5-40 мкл, 40-200 мкл;
- наконечники полипропиленовые на 5-200 мкл, 200-1000 мкл и 1000-5000 мкл;
- пробирки центрифужные полипропиленовые или стеклянные вместимостью 10,0 мл;
- мерные стаканы вместимостью 50,0–100,0 мл;
- ванночки для реагентов или стеклянные чашки Петри;
- планшеты полимерные для иммунологических реакций однократного применения с лунками вместимостью 0,20-0,25 мл и U-образным дном;
- спиртовка СЛ-1 или СЛ-2;
- бумага фильтровальная листовая для просушивания.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО 1% РАСТВОРА НКС

Для разведения диагностикума, испытуемых сывороток и иммуноглобулина человека используют 1% раствор НКС.

Во флакон с НКС вносят 2,0 мл дистиллированной воды и выдерживают при температуре от 16 до 25 °С в течение 1 мин – получают 2,0 мл 10% НКС. Затем 10% НКС разводят в 10 раз 0,9% раствором натрия хлорида – получают 1% раствор НКС. Например: к 18,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида добавляют 2,0 мл 10% раствора НКС.

Допускается хранение неиспользованного 10% раствора НКС при температуре от минус 8 °С до минус 12 °С в течение 2 недель. 1% раствор НКС хранят при температуре от 2 до 10 °С в течение 1 сут. Плохо растворившуюся сыворотку для реакции не используют.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕЙ 1% СУСПЕНЗИИ КЭД

Во флакон с диагностикумом добавляют 2,0 мл дистиллированной воды. В течение 1 мин образуется гомогенная коричневая 3% суспензия, которую оставляют при температуре от 16 до 25 °С на 2 ч для гидратации. При отстаивании образуется 2 слоя: прозрачная или слегка опалесцирующая надосадочная жидкость светло-желтого цвета и осадок коричневого цвета, разбивающийся при встряхивании. Для получения рабочей

1% суспензии 3% суспензию диагностикума разбавляют в 3 раза 1% раствором НКС. Например: к 2,0 мл 3% суспензии КЭД добавляют 4,0 мл 1% раствора НКС.

Допускается хранение остатка 3 % суспензии диагностикума во флаконе при температуре от 2 до 10 °С в течение 24 ч. 1% суспензия хранению не подлежит.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ 1% СУСПЕНЗИИ АКРОЛЕИНИЗИ- РОВАННЫХ ИЛИ ФОРМАЛИНИЗИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ БАРАНА

Для контроля испытуемых сывороток на полноту удаления бараньих изоагглютининов готовят 1% суспензию эритроцитов из 30% суспензии акролеинизированных или формалинизированных несенсибилизированных эритроцитов барана (30% суспензию акролеинизированных или формалинизированных эритроцитов перед применением отмыть 2 раза 0,9% раствором натрия хлорида). После тщательного встряхивания к 0,1 мл 30% суспензии эритроцитов добавляют 2,9 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Для контроля 90 сывороток необходимо не более 2,5 мл 1% суспензии эритроцитов.

Допускается хранение остатка 1% суспензии эритроцитов при температуре от 2 до 10 °С не более 7 суток.

ПОДГОТОВКА СЫВОРОТОК

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСПЫТУЕМЫХ СЫВОРОТОК

Испытуемые сыворотки должны быть прозрачными, светлыми, без признаков бактериального пророста и гемолиза. До серологического исследования их хранят при температуре от 2 до 10 °С или в замороженном состоянии при температуре минус 15 °С и ниже. Исследуемые сыворотки разводят 0,9% раствором натрия хлорида 1:5 (к 0,1 мл нативной сыворотки добавляют 0,4 мл 0,9% раствора натрия хлорида), прогревают при температуре (56±1) °С в течение 1 ч и истощают 30% суспензией акролеинизированных или формалинизированных несенсибилизированных эритроцитов барана, которые перед этим тщательно встряхивают. 30% суспензию эритроцитов добавляют в разведенную и прогретую сыворотку из расчёта 0,025 мл суспензии эритроцитов на 0,5 мл сыворотки, перемешивают и выдерживают при температуре (36±1) °С в течение 1 ч или при температуре от 2 до 10 °С в течение 18 ч. Эритроциты осаждают центрифугированием при 1500-2000 об/мин в течение 10 мин.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ – ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА НОРМАЛЬНОГО

Иммуноглобулин человека нормальный разводят так же, как испытуемые сыворотки – 1:5. Для этого из ампулы, содержащей иммуноглобулин, стерильно отбирают 0,1 мл и прибавляют к 0,4 мл 0,9% раствора натрия хлорида, получая таким образом, рабочее разведение иммуноглобулина 1:5, которое используют в реакции без прогревания и обработки эритроцитами.

Неизрасходованный иммуноглобулин разливают стерильно по 0,1 мл и плотно закрывают пробками.

Допускается хранение разлитого по пробиркам иммуноглобулина при температуре от 2 до 10 °С не более 20 суток.

ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ

Для исследования 1 сыворотки используют 1 ряд лунок планшета.

В соответствии с количеством испытуемых сывороток в ряды планшета во все лунки многоканальной пипеткой вносят по 0,05 мл 1% раствора НКС.

В первую и последнюю лунки каждого ряда вносят пипеткой по 0,05 мл подготовленных исследуемых сывороток и той же пипеткой, начиная с первой лунки, сыворотку перемешивают 5 раз и последовательно переносят во все лунки каждого ряда, кроме последней. Из последней лунки, в которой титровали сыворотку, удаляют 0,05 мл разведённой сыворотки. Разведение сывороток в первых и последних лунках получается, таким образом, 1:10.

Титрование иммуноглобулина человека нормального, входящего в комплект в качестве положительного контроля, производят точно так же, как испытуемых сывороток. Контроль иммуноглобулина ставят в 3-х параллельных рядах лунок планшета.

Во все лунки, кроме последней, каждого ряда многоканальной пипеткой вносят по 0,025 мл хорошо перемешанной 1% суспензии диагностикума коровьего эритроцитарного антигенного.

Обязателен контроль исследуемой сыворотки на полноту удаления бараньих изоагглютининов. Для этого в последние лунки каждого ряда, где содержатся по 0,05 мл исследуемой обработанной и разведённой 1:10 сыворотки, вносят по 0,025 мл хорошо перемешанной 1% суспензии эритроцитов барана, приготовленной из 30% суспензии формализированных или акролеинизированных несенсибилизированных эритроцитов барана.

Обязателен контроль КЭД на отсутствие его спонтанной агглютинации в 1% растворе НКС. Для этого в 4 лунки планшета вносят по 0,05 мл 1% НКС и 0,025 мл 1% суспензии диагностикума.

Обязателен контроль акролеинизированных или формализированных несенсибилизированных эритроцитов барана на отсутствие неспецифической агглютинации в 1% растворе НКС. Для этого в 4 лунки вносят по 0,05 мл 1% НКС и 0,025 мл 1% суспензии несенсибилизированных эритроцитов.

Планшет тщательно встряхивают и оставляют при температуре от 16 до 25 °С на 2 ч до полного оседания эритроцитов в контроле.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят по условной шкале четырех крестов:

++++ (4+) – эритроциты образуют перевернутый "зонтик", края его опадают;

+++ (3+) – эритроциты образуют перевернутый "зонтик", края его ровные;

++ (2+) – по краю лунки намечается тонкое кольцо из эритроцитов;

+ (1+) – по краю лунки располагается широкое кольцо из эритроцитов;

(–) – эритроциты оседают на дне лунки в виде диска или кольца.

В последних лунках каждого ряда (контроль сыворотки), где добавлена 1% суспензия формализированных или акролеинизированных несенсибилизированных эритроцитов барана, не должно быть агглютинации. При наличии агглютинации данная сыворотка должна быть повторно истощена.

В контрольных лунках с коровым эритроцитарным диагностикумом (контроль КЭД) в 1% растворе НКС не должно быть агглютинации.

В контрольных лунках с акролеинизированными или формализированными несенсибилизированными эритроцитами в 1% растворе НКС (контроль эритроцитов) не должно быть агглютинации.

Титром сыворотки или иммуноглобулина считают то последнее разведение, которое вызывает агглютинацию нагруженных коровым антигеном эритроцитов на два креста (++).

Сыворотки с титром 1:10 и выше расценивают как положительные.

При ретроспективной диагностике подтверждённым считают диагноз кори при наличии четырёхкратного и более нарастания титра антител при титровании парных сывороток:

1-ая из которых получена не позднее 3-го дня с момента появления сыпи, а 2-ая – через 3 недели после получения первой.

Титр коровьих антител в иммуноглобулине человека нормальном (положительный контрольный образец) в РПГА должен соответствовать указанному на коробке комплекта с диагностикумом и выражен величиной разведения и в МЕ/мл.

Титр коммерческих серий препарата иммуноглобулина устанавливают в Международных Единицах (МЕ).

Расчёт титра коровьих антител в препаратах иммуноглобулинов в МЕ производят по следующей формуле:

$$X = \frac{a \cdot c}{b}, \text{ где:}$$

X – титр коровьих антител в испытуемом иммуноглобулине в МЕ;

a – титр коровьих антител в иммуноглобулине – положительном контрольном образце коровьих антител в МЕ, указанный на этикетке коробки;

b – титр коровьих антител в иммуноглобулине – положительном контрольном образце коровьих антител, выраженный величиной обратной разведению, полученный в данном опыте;

c – титр коровьих антител в испытуемом иммуноглобулине, выраженный величиной обратной разведению, полученный в данном опыте.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ. СРОК ГОДНОСТИ

Транспортирование в соответствии с СП.3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 10 °С.

Хранение в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 10 °С в сухом, защищённом от света, недоступном для детей месте.

Срок годности – 1 год. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Рекламация на качество диагностикума направлять в адрес предприятия-изготовителя: Отдел новых технологий ФБУН «Санкт-Петербургский НИИЭМ имени Пастера Роспотребнадзора», по адресу: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д.14, тел./факс (812) 325-27-10 /346-83-87, <http://www.dntpasteur.ru> e-mail: pasteurdnt@ya.ru