

Федеральное бюджетное учреждение науки
**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ им. ПАСТЕРА**
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
(ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера)
197101, Россия, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14. Телефон (812) 233-20-92, факс (812) 644-63-10
E-mail: pasteur@pasteurorg.ru; www.pasteurorg.ru
ОКПО 01967164, ОГРН 001037828006314; ИНН/КПП 7813047047/781301001

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набора реагентов Диагностикум эритроцитарный коревой антигенный сухой для реакции
пассивной гемагглютинации (РПГА) (КЭД-90)
по ТУ 9398-007-01967164-2008**
Регистрационное удостоверение
№ФСР 2009/06287 от 15.08.2011 г.

Диагностикум эритроцитарный коревой антигенный сухой для реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) представляет собой 3 % акролеинизированные, танализированные бараньи эритроциты, сенсibilизированные 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 формализированные 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.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

Набор предназначен только для *in vitro* диагностики.

Входящие в компоненты набора вещества инактивированы и безопасны.

При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 и СанПиН 2.1.7.2790-10.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Диагностикум применяют в реакции пассивной гемагглютинации.

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 АКРОЛЕИНИЗИРОВАННЫХ ИЛИ ФОРМАЛИНИЗИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ БАРАНА

Для контроля испытуемых сывороток на полноту удаления бараньих изоагглютининов готовят 1% суспензию эритроцитов из 30% суспензии акролеинизированных или формализированных несенсибилизированных эритроцитов барана (30% суспензию акролеинизированных или формализированных 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 формализированных несенсибилизированных

эритроцитов барана, которые перед этим тщательно встряхивают. 30% суспензию эритроцитов добавляют в разведённую и прогретую сыворотку из расчёта 0,025 мл суспензии эритроцитов на 0,5 мл сыворотки, перемешивают и выдерживают при температуре $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч или при температуре от 2 до 10°C 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 прогрева 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°C 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, таким образом, получается 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°C 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 коревым 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 коревым 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 коревых 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 коревых антител в препаратах иммуноглобулинов в МЕ производят по следующей формуле:

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

X – титр коревых антител в испытуемом иммуноглобулине в МЕ;

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

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

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

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

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.

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

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 197101, Россия, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14.

Телефон (812) 233-20-92, факс (812) 232-92-17.

E-mail: pasteur@pasteurorg.ru; www.pasteurorg.ru