

## **ИНСТРУКЦИЯ**

по применению набора реагентов для  
выявления иммуноглобулинов класса G  
к вирусу эпидемического паротита  
«Паротит-скрин»

**ФСР 2009/04536**

**Е-0945 Паротит-скрин**

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу эпидемического паротита в сыворотке/плазме крови человека методом иммуноферментного анализа при проведении диагностических и сероэпидемиологических исследований.

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1. Принцип действия

На поверхности лунок планшета для иммунологических реакций адсорбирован вирус эпидемического паротита. При внесении в лунки планшета исследуемых образцов сывороток/плазмы крови человека антитела, специфичные к белкам вируса паротита, взаимодействуют с адсорбированными антигенами вируса, образуя иммунные комплексы. После удаления несвязавшихся антител в лунки добавляют конъюгат - мышиные моноклональные антитела к Fc-фрагменту IgG человека, меченные пероксидазой хрена, - который взаимодействует с комплексом антиген-антитело. После удаления несвязавшейся части конъюгата в лунки планшета добавляют раствор гидроперита и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Ферментативная реакция пероксидазы с хромогеном приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию IgG к вирусу эпидемического паротита в исследуемом образце. После остановки реакции стоп-реагентом интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют по оптическому поглощению при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм) на спектрофотометре. Результат интерпретируется как положительный или отрицательный при сравнении с расчетным значением ОП<sub>КРИТ</sub>. Для диагностических исследований одновременно титруют парные сыворотки, полученные от пациента с интервалом от 7 до 14 сут. Выявленная сероконверсия или повышение в 4 раза и более титра антител при тестировании парных сывороток свидетельствует о наличии паротитной инфекции.

### 2.2. Состав набора

Набор выпускается в виде реагентов, упакованных в коробку:

Компонент набора	Количество	Описание
Иммуносорбент	1 планшет в пакете	Вирус эпидемического паротита штамм Л-3, иммобилизованный в лунках разборного или монолитного полистиролового планшета для иммунологических реакций.
Положительный контрольный образец (K <sup>+</sup> )	1,5 мл 1 пробирка	Сыворотка крови человека, инактивированная, содержащая антитела IgG к вирусу эпидемического паротита и не содержащая HBsAg, антигена ВИЧ-1, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.

Отрицательный контрольный образец (K <sup>-</sup> )	1,5 мл 1 пробирка	Сыворотка крови человека, инактивированная, не содержащая антител IgG к вирусу эпидемического паротита, HBsAg, антигена ВИЧ-1, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета.
Конъюгат	15 мл 1 флакон	Антитела (мышинные моноклональные) к Fc-фрагменту IgG человека, меченные пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.
Концентрат раствора № 1 для промывания планшетов (×25)	25 мл 2 флакона	Пенящаяся прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость. Возможно расслаивание или выпадение кристаллического осадка, исчезающего при температуре от 35°С до 37°С в течение 30 мин
Раствор № 2 для разведения сывороток	30 мл 1 флакон	Пенящаяся прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета. Возможно выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.
Субстратная буферная смесь с гидроперитом (БСГ)	15 мл 1 флакон	Прозрачная бесцветная жидкость.
Хромоген (ТМБ)	1,5 мл 1 пробирка	Раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Прозрачная бесцветная жидкость.
Стоп-реагент	10 мл 1 флакон	1М раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость.

Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные.

### 3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Со всеми тестируемыми образцами, отработанными растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, обращайтесь как с потенциально биологически активными объектами:

- не пипетируйте растворы ртом, при работе используйте индивидуальные средства защиты (резиновые перчатки и защитные очки);
- все отработанные растворы обезвреживайте 4% раствором хлорамина или 6% раствором перекиси водорода при комнатной температуре в течение 3 часов, предварительно нейтрализовав жидкие отходы, содержащие кислоту, 1% раствором NaOH;

- все твердые отходы сбрасывайте в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергайте автоклавированию в течение 60 мин при 121 °С или сжигайте;

- инструменты и оборудование до и после работы протирайте 70 %-м спиртом;  
- утилизируйте отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

#### **4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

Для анализа дополнительно требуются следующие материалы и оборудование:

- дистиллированная или деионизованная вода;
- хлорамин или перекись водорода для обеззараживания;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;
- пипетки одноканальные автоматические для подачи жидкостей от 5 мкл до 1000 мкл;
- пипетки 8 (12)-канальные для подачи жидкости от 50 мкл до 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые на 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые на 1000 мкл;
- центрифуга настольная на  $(3-10) \times 10^3$  об/мин;
- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью (1,5-2,2) мл для хранения и осветления образцов сыворотки;
- пробирки полипропиленовые вместимостью (1,0-2,0) мл или вспомогательный планшет для предварительного разведения образцов сыворотки;
- мерные стаканы или цилиндры вместимостью от 50 мл до 500 мл;
- воздушный термостат на 37 °С;
- спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм);
- контейнер для сброса твердых отходов;
- автоклав для инактивации отходов;
- контейнер для слива отработанных жидкостей;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага.

Рекомендуется использование аппарата для промывания планшетов и встряхивателя для перемешивания.

#### **5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

Для проведения анализа используйте образцы (сыворотка или плазма крови человека) в объеме 10 мкл.

В предлагаемом наборе могут быть исследованы образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы готовьте и храните в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Следует осветлять

образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием (10±1) мин при (2500-3000) об/мин.

Собранные образцы сывороток или плазмы храните при температуре от 4°С до 6°С. Если образцы не могут быть протестированы в течение 72 часов, их следует хранить при температуре не выше минус 15°С. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Нельзя исследовать образцы с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания, так как это может привести к получению ложных результатов.

Для отбора каждого образца сыворотки и всех жидких компонентов набора используйте только новые наконечники.

**ВНИМАНИЕ!** Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов!

Анализ проб следует проводить так, чтобы в случае отсутствия автоматического анализатора на одного оператора одновременно приходилось не более трех-четырех планшетов.

## 6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Условия и сроки хранения компонентов набора после вскрытия индивидуальной упаковки приведены в таблице № 1:

Таблица 1. Условия и сроки хранения компонентов.

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	от 2°С до 8°С в плотно закрытом пакете	8 недель
K <sup>+</sup> , K <sup>-</sup> , конъюгат, концентрат раствора № 1 (×25), раствор № 2, БСГ, хромоген ТМБ	от 2°С до 8°С	8 недель
Стоп-реагент	от 2°С до 8°С	до окончания срока годности набора

Перед началом работы набор выдержите при комнатной температуре в течение 30 мин.

Раствор № 2, K<sup>+</sup>, K<sup>-</sup>, конъюгат, стоп-реагент готовы к применению.

### 6.1. Раствор № 1 для промывания планшетов

Содержимое флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхните. При выпадении в концентрате кристаллов прогрейте при температуре 37°С до полного растворения.

Добавьте 2 мл концентрата раствора № 1 к 48 мл деионизованной воды в расчете на каждый стрип (8 лунок). Тщательно перемешайте.

Храните не более 48 ч при температуре от 4°С до 25°С.

### 6.2. Раствор субстрата

За 10 мин до окончания реакции с конъюгатом приготовьте раствор субстрата, добавив 0,1 мл ТМБ к 1,0 мл БСГ в расчете на каждый стрип. Тщательно перемешайте.

Храните не более 30 мин при температуре от 4°С до 25°С в защищенном от света месте.

### **6.3. Подготовка испытуемых сывороток**

В случае необходимости испытуемые образцы сывороток или плазмы крови осветлите центрифугированием.

#### **6.3.1. Подготовка сывороток для проведения сероземиологических исследований**

Испытуемые сыворотки разведите в десять раз раствором № 2 для разведения сывороток во вспомогательном планшете для предварительного разведения сывороток. Для этого внесите в лунки планшета по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл испытуемых сывороток.

#### **6.3.2. Подготовка сывороток для проведения диагностических исследований**

Для лабораторного подтверждения диагноза эпидемического паротита рекомендуется исследовать парные сыворотки, полученные с интервалом от 7 до 14 сут, причем забор первой сыворотки необходимо осуществить не позднее пятых суток от начала заболевания. Тестируйте оба образца на одном планшете. Тщательно соблюдайте условия хранения образцов сывороток! Каждый образец сыворотки титруйте с двукратным шагом от 1:100 до 1:3200.

Для этого приготовьте шесть последовательных разведений каждого образца сыворотки во вспомогательных пробирках.

Например, в первую пробирку внесите 90 мкл, во вторую - 450 мкл, а в следующие 5 пробирок - по 250 мкл раствора № 2. Затем добавьте в первую пробирку 10 мкл цельной сыворотки (получая разведение 1:10) и тщательно перемешайте пипетированием. Перенесите 50 мкл полученного разведения во вторую пробирку (получая разведение 1:100) и тщательно перемешайте. После этого отберите из второй пробирки 250 мкл полученного разведения и перенесите в третью пробирку, тщательно перемешайте, затем снова отберите 250 мкл из третьей пробирки и перенесите в четвертую. Процедуру повторите далее до разведения 1:3200.

Аналогичным образом подготовьте образец сыворотки того же пациента, полученной при повторном взятии крови.

Разведенные сыворотки хранению не подлежат!

## **7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

Выньте планшет из упаковки и оставьте в каретке необходимое количество стрипов. Остальные стрипы поместите обратно в пакет и храните в соответствии с условиями, указанными в Таблице 1.

### **7.1. Порядок внесения исследуемых и контрольных образцов сывороток**

В лунки A1 и B1 внесите по 100 мкл K<sup>-</sup>, в лунки C1 и D1 - по 100 мкл K<sup>+</sup>, в лунку E1 внесите 100 мкл раствора № 2 (контроль конъюгата). В оставшиеся свободными лунки внесите по 90 мкл раствора № 2 и по 10 мкл сывороток в разведении 1:10.

При проведении диагностических исследований в лунки планшета внесите по 100 мкл всех полученных разведений парных сывороток, начиная с разведения 1:100.

Планшет заклейте пленкой (или закройте крышкой) и выдержите в течение  $(60 \pm 2)$  мин при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

### 7.2. Промывание

Удалите жидкость из лунок с помощью аппарата для промывания планшетов. Промойте планшет **пятикратно** раствором № 1 (см. п. 6.1), внося в лунки по 250 мкл промывающего раствора и выдерживая раствор в лунках не менее 20 с. После промывания тщательно удалите влагу из планшета, постукивая им по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

**ВНИМАНИЕ!** Недостаточное промывание планшетов может привести к получению ложных результатов.

**7.3.** Во все лунки планшета внесите по 100 мкл конъюгата. Планшет заклейте пленкой (или закройте крышкой) и выдержите в течение  $(60 \pm 2)$  мин при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

### 7.4. Промывание

Повторите процедуры, описанные в п. 7.2.

**7.5.** Во все лунки планшета внесите по 100 мкл раствора субстрата (см. п. 6.2). Планшет поместите в защищенное от света место на  $(15 \pm 2)$  мин при температуре от  $18$  до  $25^\circ\text{C}$ .

Не располагайте планшеты стопкой!

**7.6.** Остановите пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-реактанта и не позднее, чем через 10 мин, проведите учет результатов.

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение оптической плотности (ОП) проводить при длине волны 450 нм. Рекомендуемая длина волны сравнения (620-650) нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

Результаты измерения, полученные при анализе контрольных образцов, должны удовлетворять следующим требованиям:

среднее значение ОП в лунках с положительным контролем ОП ( $K^+$ ) - не менее 1,00 о.е.;

среднее значение ОП в лунках с отрицательным контролем (ОП  $K^-$ ) - менее 0,200 о.е.;

ОП в лунке с контролем конъюгата - менее 0,100 о.е.

При получении иных показателей исследование повторите.

### 8.1. Учет результатов при сероэпидемиологических исследованиях

Рассчитайте значение  $ОП_{\text{КРИТ}}$  по формуле:

$$ОП_{\text{КРИТ}} = (ОП K^-) + A, \text{ где } A=0,2$$

Результат анализа считается положительным, если для исследуемого образца  $ОП \geq ОП_{\text{КРИТ}}$ .

Результат анализа считается отрицательным, если для исследуемого образца  $ОП < ОП_{\text{КРИТ}}$ .

## 8.2. Учет результатов при диагностических исследованиях

Последнее разведение сыворотки, при котором значение ОП остается больше или равным ОП<sub>КРИТ</sub>, соответствует титру антител в данной сыворотке.

Для выявления повышения титра антител в парных образцах сывороток необходимо определить титр антител в каждом образце сыворотки и сравнить между собой титры парных сывороток. Титр выражается величиной обратной разведению сыворотки, при котором регистрируется положительный результат анализа. Например: разведению сыворотки 1:200 соответствует титр 200.

Вычислите отношение T2 к T1, где:

T1 - титр антител в сыворотке, полученной при первом взятии крови;

T2 - титр антител в сыворотке, полученной при втором взятии крови;

Результат исследования считается положительным, если:

а) отношение  $T2/T1 \geq 4$ ;

б) выявлена сероконверсия (отсутствие антител в первой сыворотке и наличие антител во второй сыворотке) независимо от титра сыворотки.

Результат исследования считается отрицательным, если отношение  $T2/T1 < 4$ .

Оценку результатов диагностических исследований следует проводить на основании одновременного исследования титров парных сывороток. Выявленная сероконверсия или повышение в 4 раза и более титра антител, в сыворотке, полученной на более позднем сроке, свидетельствует о наличии паротитной инфекции.

Необходимо учитывать, что отсутствие повышения титра антител в парных сыворотках может быть вызвано неверно выбранным интервалом взятия крови у пациента. Поэтому, если в парных сыворотках определены одинаковые или отличающиеся не более, чем в два раза, титры антител к вирусу паротита, то для подтверждения острой инфекции такие сыворотки целесообразно исследовать на содержание антител IgM к вирусу эпидемического паротита.

Для установления диагноза следует учитывать как данные результатов лабораторных исследований, так и всю сумму клинических проявлений и эпидемиологического анамнеза.

## 9. СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности набора 12 месяцев. Запрещается применение набора и его компонентов после окончания срока годности набора.

Наборы транспортируйте и храните в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8°C. Замораживание не допускается. Допускается транспортировка в течение 3 суток при температуре от 9 до 30°C.