

Слайды с клетками, инфицированными коронавирусом SARS

Только для научных исследований

Тест-система	Субстрат	Вид	Количество слайдов × полей
FI 2601-1010 A	Клетки — инфицированные SARS-CoV и неинфицированные	EU 14	10 x 10 (100)
FI 2601-1010 A			10 x 10 (100)
FI 2601-1010 M			10 x 10 (100)
FI 2601-2010 A			20 x 10 (200)
FI 2601-2010 G			20 x 10 (200)
FI 2601-2010 M			20 x 10 (200)

В комплекте содержатся слайды с 2 BIOCHIP в каждой реакционной области, один из которых содержит клетки, инфицированные коронавирусом SARS (SARS), а другой — неинфицированные клетки. Слайды можно использовать для непрямой иммунофлуоресценции (PFT). К настоящему времени с использованием этих слайдов методом PFT было изучено большое количество больных SARS. Положительный результат реакции наблюдался почти во всех сыворотках больных SARS, а результаты для всех сывороток от здоровых доноров или пациентов с другими вирусными инфекциями (например, ВИЧ, HCV или HBV) были отрицательными. Слайды были приготовлены в сотрудничестве с институтом Роберта Коха, Берлин, Германия. Изолят вируса был любезно предоставлен Институтом Медицинской Вирусологии, Университет Иоганна Вольфганга Гете, Франкфурт, Германия. **Эффективность PFT с использованием слайдов для выявления антител к SARS в настоящее время изучена недостаточно. EUROIMMUN не несет никакой ответственности за верные или неверные результаты исследования, функционирование тест-системы или интерпретацию результатов исследования. Дополнительную информацию см. в разделе «Гарантия и Обязательства» (“Warranty and Liability”) Общих Условий Распространения тест-систем EUROIMMUN.**

Принцип исследования: BIOCHIP инкубируют с разведенным образцом сыворотки. Если образец инфицирован, к антигенам вируса в инфицированных клетках присоединяются специфические антитела. На втором этапе присоединившиеся антитела окрашиваются антителами к антигенам человека, мечеными флуоресцеином, и становятся видны во флуоресцентном микроскопе.

Содержание комплекта на 100 реакций: (IgG)

Описание	Формат	Символ
1. Слайды, каждый из которых содержит 10 × 2 BIOCHIP один из них содержит клетки, инфицированные SARS, а другой — неинфицированные клетки	10	.SLIDE.
2. антитела к IgG человека (козы), меченые флуоресцеином, концентрированные в 5 раз	1 x 0,6 мл	.CONJUGATE 5x
3. Сыворотка больного SARS, готовая для применения	1 x 0,1 мл	.POS CONTROL.
4. Сыворотка здорового донора крови, готовая для применения	1 x 0,1 мл	.NEG CONTROL.
5. Буфер для обработки образца	3 x 4,5	SAMPLE BUFER
6. Реактив для приготовления фосфатного буфера с pH 7,2	2 упаковки	.PBS.
7. Tween 20	2 x 2,0 мл	.TWEEN 20.
8. Среда для фиксации, готовая для применения	1 x 3,0 мл	.GLYCEROL.
9. Покровные стекла (62 мм × 23 мм)	12	.COVERGLASS.
10. Инструкция	1	
Описание серии	IVD Исследование In vitro	
Температура хранения	использовать до (при условии сохранности упаковки)	

Каждый слайд (например, EUROIMMUN No. FK 2601-1010) укомплектован покровным стеклом.

Для проведения исследования необходимы лотки для реагентов, не входящие в комплект поставки. Их можно

заказать в EUROIMMUN по следующим номерам каталога:

- ZZ 9999-0110 для слайдов, содержащих до 10 полей

Хранение и обеспечение сохранности: Слайды следует хранить при температуре от -40°C (не ниже) до $+8^{\circ}\text{C}$, а реагенты — при температуре от $+2^{\circ}\text{C}$ до $+8^{\circ}\text{C}$. Сохранность тест-системы гарантируется в течение 12 месяцев после даты выпуска.

Проведение исследования

Методика **TITERPLANE** была разработана EUROIMMUN для стандартизации иммунологических исследований: Образцы или меченые антитела помещают в реакционные поля лотка с реагентами. Затем в углубления лотка с реагентами помещают слайды BIOCHIP, чтобы все эти слайды соприкасались с полями, и отдельные реакции происходили одновременно. Положение и высота капель благодаря геометрическому устройству системы оказываются точно определены. Поскольку жидкости оказываются пространственно ограничены, необходимости в применении стандартной «увлажняющей камеры» нет. Появляется возможность инкубировать любое количество образцов последовательно и одновременно в идентичных условиях.

Подготовка: Подготовка реагентов и сыворотки или плазмы (образцов) описана на **странице 4** данной инструкции.

Раскапывание: Введите **25 мкл разведенной сыворотки** в каждое поле лотка для реакций, избегая попадания в них пузырьков воздуха. Внесите все исследуемые образцы до начала инкубации (до 200 капель). Используйте пластиковый шаблон для нанесения образцов.

Инкубация: Реакция начинается после введения слайдов BIOCHIP в соответствующие углубления реакционного лотка. Убедитесь, что каждый образец соприкасается с соответствующим BIOCHIP и что отдельные образцы не контактируют друг с другом. Инкубируйте в течение **30 минут** при комнатной температуре.

Промывание: Промойте слайды BIOCHIP струей раствора PBS–Tween (забуференный физиологический раствор – Tween) с помощью лабораторного стакана, а затем немедленно поместите их в кювету, содержащую PBS–Tween не менее чем на **5 минут**. По возможности рекомендуется перемешивание с помощью вращательного шейкера (до 300 оборотов в минуту).

Раскапывание: Внесите в каждое поле чистого реакционного лотка **20 мкл глобулина к антигенам человека, меченого флуоресценном** (конъюгата). Добавьте все раскапываемые реагенты (одна упаковка максимально на 50 слайдов) до продолжения инкубации. Пользуйтесь шаговой пипеткой. Меченую сыворотку с антителами к антигенам человека нужно перемешать с помощью пипетки до использования. Разведите ее PBS–Tween. Для экономии времени конъюгат можно раскапать в отдельный реакционный лоток, содержащий разбавленную сыворотку, во время инкубации.

Инкубация: Выньте один слайд BIOCHIP из PBS–Tween. В течение 5 секунд промокните только тыльную и переднюю стороны бумажной салфеткой и немедленно внесите слайд BIOCHIP в углубления реакционного лотка. Не высушивайте участки между реакционными полями. Убедитесь, что BIOCHIP и жидкость вступили в соприкосновение. Затем повторите процедуру для следующего слайда BIOCHIP. С этого момента не следует допускать контакта слайдов с прямым солнечным освещением. Инкубируйте в течение **30 минут** при комнатной температуре.

Промывание: Промойте слайды BIOCHIP струей раствора PBS–Tween (забуференный физраствор – ТВИН) с помощью лабораторного стакана, а затем немедленно поместите их в кювету, содержащую PBS–Tween не менее чем на **5 минут**. По возможности рекомендуется перемешивание с помощью вращательного шейкера (до 300 оборотов в минуту). Для предотвращения переокрашивания можно добавить по 10 капель реактива Evans Blue на каждые 150 мл фосфатного буфера.

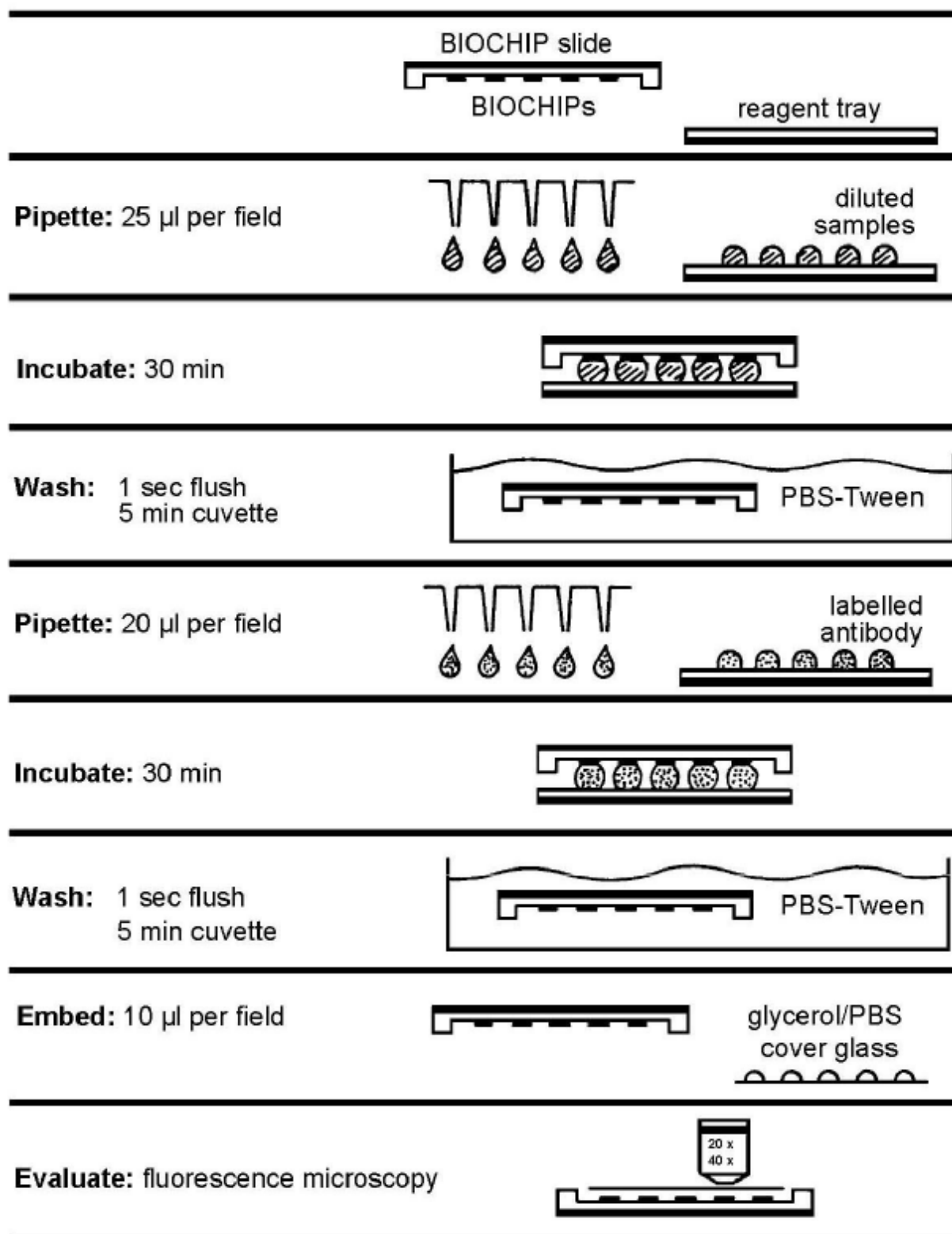
Фиксация: Раскапайте глицерин/забуференный физраствор на покровное стекло каплями по **10 мкл на каждое реакционное поле**. Используйте пластиковый шаблон для остановки реакции. Выньте один слайд BIOCHIP из PBS–Tween и высушите его тыльную сторону, все четыре боковые стороны и переднюю поверхность перед, но не между реакционными полями с помощью бумажной салфетки. Положите слайд BIOCHIP лицевой стороной вниз на подготовленное покровное стекло. Немедленно проверьте, чтобы покровное стекло оказалось правильно расположено в углублениях слайда. При

необходимости поправьте его положение. После этого повторите процедуру для следующего слайда BIOCHIP.

**Оценка
результатов
окрашивания:**

Оцените наличие флуоресценции под микроскопом. Для срезов органов используйте объектив увеличением 20×, для инфицированных клеток — увеличением 20×, для клеточных субстратов — увеличением 40×. Возбуждающий светофильтр: 488 нм, разделитель цвета: 510 нм, блокирующий светофильтр: 520 нм. Источник света: парортутная лампа мощностью 100 Вт.

Схема методики TITERPLANE



Слайд BIOCHIP

BIOCHIP

реакционный лоток

разведенные
образцы**Раскапывание:** 25 мкл на каждое
поле**Инкубация:** 30 мин**Промывание:** в течение 1 секунды
струей жидкости
5 минут в кювете

PBS-Tween

Раскапывание: 20 мкл на каждое
полемеченый
антителами**Инкубация:** 30 мин**Промывание:** в течение 1 секунды
струей жидкости
5 минут в кювете

PBS-Tween

Фиксация: 10 мкл на каждое полеглицерин/забуференный
физраствор
покрывное стекло20 x
40 x**Оценка результатов окрашивания:** флуоресцентная
микроскопия**Подготовка и обеспечение сохранности реагентов**

Примечания: Все реагенты перед использованием нужно прогреть до комнатной температуры. Отдельные реагенты из одной серии специально подобраны для совместного использования; в большинстве случаев их замена реагентами из других серий недопустима. Все реагенты сохраняют пригодность к употреблению в течение указанного срока годности при хранении при температуре от +2°C до +8°C и предотвращении загрязнения, если ниже не указано иное.

Слайды: Готовы для применения. Удаляйте защитное покрытие только после прогревания слайдов до комнатной температуры (водяной конденсат может повредить субстрат). Наносите пометки на слайды фломастером. Не прикасайтесь к BIOCHIP. После удаления защитного покрытия слайды следует инкубировать в течение 15 минут. Если защитное покрытие повреждено, слайды для диагностического исследования использовать нельзя.

Вторичные антитела, меченые флуоресцеином: Разведите их PBS-Tween в отношении 1 : 5. Перед первым использованием тщательно перемешайте пипеткой. Забирайте только необходимое количество разведенного реагента, и используйте его в течение 1 суток.

Сыворотка больных SARS и здоровых доноров крови: Готова для применения. Перед первым использованием тщательно перемешайте пипеткой.

Буфер для обработки образца: Готов для применения.

PBS-Tween: 1 упаковку «Реактива для приготовления фосфатного буфера» следует развести в 1 литре дистиллированной воды (оптимально: воды для инъекций — aqua pro infusione, aqua ad injectabilia) и смешать с 2 мл Tween 20. Подготовленный раствор PBS-Tween обычно допускается хранить при температуре от +2°C до +8°C в течение 1 недели. PBS-Tween не допускается использовать, если раствор становится мутным или загрязненным.

- Среда для фиксирования: Готова для применения.

Предостережение: Слайды BIOCHIP, покрытые антигенными субстратами, обработаны дезинфицирующим фиксирующим веществом и гамма-излучением. Тем не менее, все компоненты тест-систем следует

обрабатывать, как потенциально инфицированный материал. Ряд реагентов содержат токсическое вещество азид натрия. Следует избегать их попадания на кожу.

Ликвидация использованных материалов: Образцы неразведенных сывороток и слайды следует обрабатывать, как инфекционный материал. Буферные растворы не требуется обрабатывать отдельно, если иное не предусмотрено официальными инструкциями.

Подготовка и обеспечение сохранности образцов плазмы и сыворотки

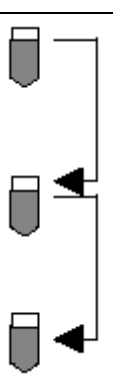
Сохранность: Образцы для исследования следует хранить при температуре от +2°C до +8°C в течение не более 14 суток. В замороженном состоянии (без размораживания) образцы допустимо хранить до 28 суток. В этих случаях образцы следует осмотреть и выявить появление запаха (свидетельствующее о загрязнении бактериями). Разведенные образцы следует инкубировать в течение 1 рабочего дня.

Антитела класса IgM: Перед определением специфических антител класса IgM, из сыворотки пациента следует удалить антитела класса IgG – с помощью методов ультрацентрифугирования, хроматографии, иммуноабсорбции (например, EUROSORB: номер по каталогу EUROIMMUN: ZF 1270-0145). Это позволяет предотвратить специфическое связывание ревматоидного фактора класса IgM, содержащегося в сыворотке, с IgG, приводящее к ложноположительной реакции на наличие IgM, а также отделение IgM от антигена под действием специфических IgG (ложноотрицательная реакция). Метод иммуноабсорбции позволяет одновременно удалить ревматоидный фактор (абсорбент RF).

Рекомендации по разведению образцов для количественного исследования: Определение антител классов IgA и IgG. Образцы сыворотки для исследования разводят в специальном буфере для обработки образцов в отношении 1 : 10. Например, для разведения в отношении 1 : 10 разведите 11,1 мкл сыворотки в 100 мкл буфера для обработки образцов и тщательно перемешайте (например, взбалтывая в течение 4 секунд).

Определение антител класса IgM: Исследуемый образец разводят в отношении 1 : 10 в растворе EUROSORB (для реакции иммуноабсорбции) или в буфере для обработки образцов (для ультрацентрифугирования или хроматографии). Например, разведите 11,1 мкл сыворотки в 100 мкл раствора EUROSORB и тщательно перемешайте (например, взбалтывая в течение 4 секунд).

Рекомендации по разведению образцов для количественного исследования: Раствор исследуемых образцов сыворотки подготавливают с помощью буфера для обработки образцов. Для определения IgG и IgA рекомендуется одновременно ставить реакции в разведениях 1 : 10, 1 : 100 и 1 : 1000, а для определения IgM — в разведениях 1 : 10 и 1 : 100. Для каждого разведения добавьте 100 мкл буфера для обработки образцов в пробирку и смешайте с 11,1 мкл следующей по величине концентрации (например, путем перемешивания в течение 2 секунд).

Разведение	Схема разведения	
1:10	100 мкл буфера для обработки образцов + 11,1 мкл неразведенного образца	 <p>Для разведения 1 : 1000 следует использовать новый наконечник пипетки, чтобы предотвратить перенос материала на другой образец</p> <p>11.1 мкл</p> <p>11.1 мкл</p>
1:100	100 мкл буфера для обработки образцов + 11,1 мкл образца, разведенного в отношении 1 : 10	
1:1,000	100 мкл буфера для обработки образцов + 11,1 мкл образца, разведенного в отношении 1 : 100	

Оценка результатов исследования: Титр антител оценивают по интенсивности флуоресценции, полученной для различных разведений образцов. Согласно существующим клиническим данным, положительной следует считать реакцию с разведениями сыворотки в отношении 1 : 10 и выше. Для выработки более точных критериев оценки существующих в настоящее время данных недостаточно.

Флуоресценция в разведении:			Титр антител
1:10	1:100	1:1,000	
слабая	отрицательная	отрицательная	1:10
умеренная	отрицательная	отрицательная	1:32
значительная	слабая	отрицательная	1:100
значительная	умеренная	отрицательная	1:320
значительная	значительная	слабая	1:1,000
значительная	значительная	умеренная	1:3,200
значительная	значительная	значительная	1:10,000

Литература

Наиболее свежая информация по клиническому значению SARS-CoV, обработке образцов и расходных материалов, эпидемиологии и диагностике может быть получена с Интернет-страниц института Роберта Коха (www.rki.de), Всемирной Организации Здравоохранения (www.who.int), Центров по Профилактике и Контролю за Заболеваемостью США, Атланта (www.cdc.gov).

О случаях подозрения на SARS следует сообщать в соответствующий центр ВОЗ (адреса см.: <http://www.who.int/csr/sars/testing/en/>)

Информация о EUROIMMUN

EUROIMMUN был основан в 1987 г., его центральный офис расположен в Любеке, Германия. Отделения находятся в Гросс Грёнау (Groß Grönu) вблизи Любека и в Ренненсдорфе (Rennersdorf), Саксония, Германия. Основатель и главный менеджер компании — клинический патолог, доктор медицинских наук Винфрид Штёкер (Winfried Stöcker). В настоящее время в штате EUROIMMUN в Германии находится 300 сотрудников (по всему миру — более 400).

EUROIMMUN производит реагенты для **медицинской лабораторной диагностики**. Основное направление деятельности — тест-системы для определения различных антител в сыворотке пациентов для диагностики **аутоиммунных, инфекционных и аллергических заболеваний**. EUROIMMUN — один из ведущих производителей наборов для диагностики аутоиммунных заболеваний в мире, но также производит наборы для серологической диагностики инфекций и аллергических заболеваний. Значительные возможности развития компании обусловлены главным образом широким набором и высочайшим качеством предлагаемых продуктов.

Из методов исследования используются преимущественно **непрямая иммунофлуоресценция, ИФА на микроплашках**, различные методы иммуноблоттинга, в том числе **Westernblot, EUROBLot, EUROLINE**. Основное значение компания придает современным методам производства и микроаналитическим методам, например, методикам BIOCHIP и TITERPLANE™, на которые компания владеет мировыми патентами.

Для выработки реагентов EUROIMMUN применяет методы, аналогичные используемые в электронике для создания микросхем. Стекланные пластинки толщиной с лист бумаги покрывают клетками или срезами тканей, а затем автоматически нарезают на фрагменты миллиметрового размера (BIOCHIP). Затем они последовательно приклеиваются на слайды с помощью устройства, управляемого компьютером. Методика BIOCHIP обеспечивает чрезвычайную миниатюризацию и стандартизацию исследования. Ряд слайдов BIOCHIP с различными покрытиями можно располагать последовательно в одном реакционном поле и инкубировать с образцами крови одного пациента. Подробный профиль антител с минимальными усилиями на инкубацию позволяет получить методика "BIOCHIP Mosaics", изготовленная из 30 и более различных срезов органов, клеточных субстратов или определенных антигенов (**EUROPLUS**). Кроме того, EUROIMMUN предлагает значительный набор соответствующих методов подготовки биологических материалов.

Методика **TITERPLANE™**, разработанная EUROIMMUN, также представляет собой прорыв в технологиях упрощения и стандартизации иммунологических исследований: Образцы или меченые антисыворотки помещают в реакционные поля лотка с реагентами. Затем в углубления лотка с реагентами помещают слайды BIOCHIPs, чтобы все эти слайды соприкасались с полями, и отдельные реакции происходили одновременно. Поскольку жидкости оказываются пространственно ограничены, необходимости в применении стандартной «увлажняющей камеры» нет. Положение и высота капель благодаря

геометрическому устройству системы оказываются точно определены. Тем самым создаются условия для последовательной или одновременной инкубации большого количества образцов в идентичных условиях.

При **иммуноферментном анализе** EUROIMMUN применяет в качестве субстрата определенные антигены, очищенные с помощью современных биотехнологических методов. Многие из этих антигенов синтезированы в молекулярно-биологической лаборатории компании. Иммуноферментный анализ отличается чрезвычайной стабильностью, простотой проведения и коротким временем инкубации, поэтому идеален для автоматизированных исследований. Все реагенты поставляются в виде, готовом для применения, и их различные серии взаимозаменяемы. EUROIMMUN предлагает наиболее обширный спектр наборов для иммуноферментного анализа аутоиммунных и инфекционных заболеваний в мире.

Инновационные методы **EUROBLOT** и **EUROLINE**, разработанные компанией EUROIMMUN, основаны на принципе иммуноферментного анализа с включением технологий TITERPLANE™ и BIOCHIP. В определенном положении на мембранных полосках в виде параллельных линий размещены очищенные антигены. После инкубации результаты можно оценить визуально без использования дополнительного оборудования. Эти продукты особенно эффективны для дифференциации антител, которые трудно четко оценить при микроскопии с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Кроме того, для применения EUROBLOT и EUROLINE не требуется сложное оборудование.

EUROIMMUN производит широкий набор тест-систем для **вестерн-блоттинга** и реагентов для подтверждения положительного результата методов непрямой иммунофлуоресценции и иммуноферментного анализа, а также для уточнения сомнительных результатов аутоиммунных, серологических инфекционных и аллергологических исследований. Для эффективного выделения диагностически значимых белков предложены оригинальные электрофоретические методы. Для оценки характера реакции тест-полосок разработаны плашки для анализа различных серий наборов реагентов. Программа оценки **"EUROSCAN"** позволяет упростить анализ результатов исследования большого количества образцов.

Всего за несколько лет EUROIMMUN стала **в Германии лидером на рынке систем для диагностики аутоиммунных заболеваний**. Клиентами компании стали почти все средние и крупные диагностические лаборатории Германии. Компания стала мировым лидером в разработке некоммерческих методов исследования.

Одним из преимуществ компании можно считать ее технологические достижения. Они включают не только разработку и продажу медицинской лабораторно-диагностической аппаратуры, но также и применение продуктов компании для диагностики. Будучи клиническим патологом, главный менеджер совместно с рядом специалистов компании обеспечивает деятельность **метрологической лаборатории по высокоспецифичной дифференциальной диагностике**. Деятельность этой лаборатории устанавливает стандарты лабораторной диагностики в Германии и во всем мире, обеспечивая уникальные возможности диагностики аутоиммунных заболеваний. Спектр диагностических возможностей лаборатории включает также серологическую диагностику инфекционных и аллергических заболеваний. Метрологическая лаборатория получает образцы сывороток со всей Германии, а также из многих стран, и позволяет верифицировать полученные потребителями компании EUROIMMUN результаты.

Значительная часть образцов сывороток, направляемых в EUROIMMUN, анализируются в качестве **дополнительной услуги** для лабораторий-потребителей компании EUROIMMUN, что позволяет поддерживать высокие стандарты работы этих лабораторий. Потребители могут также получить дополнительную **техническую информационную поддержку** опытных научных сотрудников компании, с которыми они также могут обсудить возникающие трудности серологической диагностики.

В октябре 2002 г., в немецком отделении компании EUROIMMUN сотрудничали 38 выпускников университетов и колледжей, в том числе биологи, биохимики, химики, инженеры, врачи. В компании работало большое количество (66 сотрудников) медицинских лаборантов, что соответствует объемам деятельности компании. Среди них было 14 лаборантов биологов/химиков и 19 преподавателей по подготовке лаборантов-биологов и менеджеров по продаже. Большинство сотрудников составляли женщины (218 из 304 человек).

Большое значение компания EUROIMMUN придает **консультированию** имеющихся и возможных потребителей, которое проводится преимущественно в виде **конкретных методологических некоммерческих рекомендаций** с полным обеспечением продуктами, требующимися для диагностических исследований. Продукты компании EUROIMMUN обеспечиваются поддержкой энергичной и компетентной службой продаж, качественными информационными материалами, подробными инструкциями и научно обоснованной, но доступно изложенной рекламой в научных журналах. Рекламные материалы, включая полностью электронные интерактивные руководства, производятся в самой компании с использованием наиболее современных методов донесения информации. Наиболее важные публикации и постеры переводятся на многие языки. Компания EUROIMMUN разработала Интернет-страницу

(www.euroimmun.de), содержащую большое количество информации и все более активно посещаемую специалистами из разных стран мира.

Диагностические системы EUROIMMUN используют более 2000 лабораторий по всему миру: 400 из них расположены в Германии, остальные в различных странах, включая Аргентину, Австралию, Австрию, Бельгию, Болгарию, Хорватию, Кипр, Чехию, Данию, Эстонию, Финляндию, Францию, Великобританию, Грецию, Венгрию, Исландию, Индию, Ирак, Ирландию, Израиль, Италию, Иорданию, Корею, Латвию, Ливан, Литву, Люксембург, Мексику, Нидерланды, Новую Зеландию, Норвегию, Оман, Польшу, Португалию, Словакию, Словению, Испанию, Южную Африку, Швецию, Швейцарию, Сирию, Тайвань, Турцию, Арабские Эмираты, США, Йемен, Югославию. Компания EUROIMMUN недавно основала дочерние компании в Италии (Падуа), Китае (Гонконг, Пекин, Хандчжоу), Сингапуре, Польше (Вроцлав), Великобритании (Кардифф), Арабских Эмиратах (зона SAIF), Леване (Бейрут). Дочерние компании планируется также открыть в США, Японии и Южной Африке.

Развитие компании характеризуется **устойчивым ростом**. Хотя рынок диагностических средств в Германии после проведения реформы лабораторного дела в 1999 г. стабилизировался, и конкуренция на нем значительно обострилась, компания EUROIMMUN сохранила способность к быстрому росту. В настоящее время она обеспечила себе все уменьшающуюся зависимость от рынка в Германии, поскольку все больше ее продуктов продаются за рубежом. Благодаря высокому качеству и стандартизации **продукты компании EUROIMMUN занимают лидирующие позиции в мире.**

