

Набор для диагностики антител к коронавирусу SARS класса IgG с помощью иммуноферментного анализа

1. Теоретические основы применения

Набор предназначен для выявления антител класса IgG к SARS-CoV в крови больных SARS с целью подтверждения клинического диагноза SARS.

2. Комплект поставки

1. срез клеток Vero-E6, инфицированных SARS-CoV и содержащих антигены вируса
2. положительный контроль с антителами к SARS (сыворотка больных SARS)
3. отрицательный контроль — сыворотка крови здоровых лиц
4. антитела к IgG человека для иммунофлуоресцентного исследования
5. раствор для разведения антител, предназначенных для иммунофлуоресцентного исследования
6. раствор для разведения образцов сыворотки
7. инструкции

3. Методика проведения исследования

Разведите образцы сыворотки в 10 раз (1 : 10) с помощью раствора для разведения сыворотки, затем инактивируйте образцы нагреванием при 56 градусах С в течение 30 минут.

Выдержите срез клеток, содержащих антиген, при комнатной температуре в течение 5 минут.

Разведите инаktivированные образцы сыворотки повторно, чтобы обеспечить итоговую концентрацию 1 : 20.

Добавьте по 10 мкл разведенной в отношении 1 : 10 и 1 : 20 сыворотки в различные ячейки (см. Рисунок).

Поместите срезы клеток, содержащих антиген, во влажную камеру на 30 минут, промойте их водой и затем высушите при комнатной температуре.

Разведите антитела к IgG человека для иммунофлуоресцентного исследования с помощью специального раствора, предназначенного для разведения антител для иммунофлуоресцентного исследования, в отношении 1 : 40, и добавьте 10 мкл в каждую плашку, содержащую срез клеток, содержащих антиген.

Поместите срез клеток, содержащих антиген, во влажную камеру при температуре 37 градусов С на 30 минут. Промойте и высушите срезы, упомянутые на этапе 4.

Оцените под флуоресцентным микроскопом результаты окрашивания мембран или плазмы клеток с помощью специального красителя.

Для каждого образца следует провести исследование с положительным и отрицательным контролем.

Оценка результатов: Положительный — специфическое иммунофлуоресцентное окрашивание выявляется на мембране или в плазме клеток; отрицательный — отсутствие специфического окрашивания.

Набор для диагностики антител к коронавирусу SARS класса IgG с помощью иммуноферментного анализа

1. Теоретические основы применения.

В плашку на 96 ячеек были внесены клетки линии Vero-E6, инфицированные вирусом SARS-CoV, выделенным Военно-медицинской Академией, и лизат культуры клеток, инфицированных вирусом SARS-CoV. Кроме того, в набор были включены антитела к IgG человека, связанные с ферментами, и другие реагенты. Антитела к вирусу SARS-CoV в сыворотке больных SARS были выявлены с помощью набора согласно теоретическим представлениям о механизмах действия иммуноферментного анализа.

2. Комплект тест-системы:

Плашка, содержащая вирус SARS-CoV

Раствор IgG к антигенам человека, связанных с ферментом

Раствор для разведения образцов

Концентрированный раствор для промывания × 50

Сыворотка для положительного контроля

Сыворотка для отрицательного контроля

Раствор субстрата А

Раствор субстрата В

Раствор для прекращения реакции

инструкции

Покровная пленка

3. Ход исследования

В каждом исследовании предусмотрена 1 ячейка с пустым контролем, 1 ячейка с положительным контролем, 2 ячейки с отрицательными контролями. В ячейке с пустым контролем раствора нет, в ячейках с положительным и отрицательным контролями находятся по 50 мкл положительной и отрицательных контрольных сывороток, соответственно. В других ячейках находятся по 100 мкл раствора для разведения образцов и по 10 мкл сыворотки образца. Растворы полностью перемешивают, затем закрывают покровной пленкой и оставляют при 37 градусах С на 30 минут.

Раствор для промывания, концентрированный в 50 раз, разводят до рабочей концентрации.

Удаляют содержимое из каждой ячейки и добавляют в них раствор для промывания в рабочей концентрации, затем через несколько секунд удаляют его. Повторяют промывание 5 раз.

4) Добавляют по 100 мкл раствора IgG к антигенам человека, связанных с ферментом, в каждую ячейку, кроме ячейки с пустым контролем, закрывают покровной пленкой и инкубируют при 37 градусах С в течение 20 минут.

Удаляют содержимое, промывают ячейки раствором для промывания 5 раз.

Добавляют по 50 мкл раствора субстрата А в каждую ячейку, затем добавляют по 50 мкл раствора субстрата В в каждую ячейку, аккуратно перемешивают и инкубируют при 37 градусах С в течение 10 минут **не на свету**.

Добавляют по 50 мкл раствора для прекращения реакции в каждую ячейку и перемешивают, затем, определяют оптическую плотность каждой ячейки при освещении с длиной волны 450 нм (при длине волны сравнения 630 нм), принимая плотность пустого контроля за нулевое значение.

4. Контроль качества исследования

Оптическая плотность положительной контрольной сыворотки должна быть не менее 0,50.

Оптическая плотность отрицательной контрольной сыворотки должна быть не более 0,10.

В других случаях исследование проведено неверно.

5. Определение результатов исследования.

- 1) Для определения итоговой оптической плотности отрицательного и положительного контролей и исследуемых образцов из значений оптической плотности для них нужно вычесть оптическую плотность пустого контроля.
- 2) Если оптическая плотность всех отрицательных контролей оказалась ниже 0,05, значение принимают равным 0,05.
- 3) Предел оценки определяют по следующей формуле: $= 0,13 + \text{среднее значение для сывороток отрицательного контроля}$
- 4) Если оптическая плотность исследуемого образца больше предела оценки, результат исследования для него считают положительным. Если она меньше предела, результат исследования считают отрицательным. Если оптическая плотность близка к пределу оценки, исследование следует повторить.

6.

Тест-система предназначена для исследования антител, специфичных для SARS, а эти антитела вырабатываются только через несколько суток после развития инфекции. Поэтому отрицательный результат исследования не гарантирует исключения инфекции SARS. Для диагностики SARS необходимо учитывать клинические данные и результаты других экспериментальных исследований.

Ниже приводятся референтные данные для данной тест-системы, полученные в одной из клиник в Гонконге (Beijing): через 7 суток после развития инфекции частота выявления антител к вирусу SARS была 0%. Через 8–10 суток после начала инфекции частота выявления антител составила 42%. Более чем через 10 суток частота выявления антител составила 67%.