

Аутоантитела к SARS-CoV (класса IgG)

Инструкция по проведению ИФА

Тест-система	Субстрат антител	Класс иммуно-глобулинов	Субстрат	Формат
EI 2601-9601 G	SARS-CoV	IgG	Плашка с рядами ячеек, покрытыми антигенами	96 x 01 (96)

Принципы проведения исследования: Тест-система предназначена для полуколичественного лабораторного определения человеческих антител класса IgG к SARS-CoV в сыворотке или плазме крови методом ИФА. В комплект тест-системы входят плашки для микротитрования, содержащие 8 рядов отделяемых ячеек, содержащих реагент, покрытый антителами к SARS-CoV. На первом этапе реакции разведенные образцы плазмы или сыворотки крови пациента инкубируют в плашке. Если в образцах содержится антиген, с ним связываются специфические антитела класса IgG (а также IgA и IgM). Для выявления связавшихся антител проводят второй этап реакции — инкубацию антител к IgG человека, покрытых антителами (ферментный конъюгат), которые могут запускать реакцию окрашивания.

Комплект тест-системы:

Компонент	Цвет	Формат	Символ
1. Плашка с ячейками покрытие антигенами: по 12 рядов ячеек в каждой плашке в каждом ряду содержится 8 отделяемых ячеек готовых к использованию	—	12 x 8	.STRIPS.
2. Калибровочный раствор (IgG, человеческий), готовый к использованию	темно-красный	1 x 2.0 мл	.CAL
3. Положительный контроль (IgG, человеческий), готовый к использованию	голубой	1 x 2.0 мл	.POS CONTROL.
4. Отрицательный контроль (IgG, человеческий), готовый к использованию	зеленый	1 x 2.0 мл	.NEG CONTROL.
5. Ферментный конъюгат антитела к IgG человека (кроличьи), меченые пероксидазой, готовый для применения	красный	1 x 12 мл	.CONJUGATE.
6. Буфер для обработки образца готовый для применения	светло-голубой	1 x 100 мл	.SAMPLEBUFFER.
7. Буфер для промывания 10x концентрат	бесцветный	1 x 100 мл	.WASHBUFFER 10x.
8. Хромоген / раствор субстрата TMB/H ₂ O ₂ , готовый для применения	бесцветный	1 x 12 мл	.SUBSTRATE.
9. Раствор для прерывания реакции 0,5 М серная кислота, готовая для применения	бесцветный	1 x 12 мл	.STOP SOLUTION.
10. Инструкция к тест-системе	—	1 буклет	

11. Протокол с контрольными значениями	—	1 протокол	
12. Защитная фольга	—	3 листа	
.LOT. Серия .IVD. Исследование In vitro		температура хранения использовать до (при условии сохранности упаковки)	

Хранение и обеспечение сохранности: Тест-система должна храниться при температуре от +2°C до +8°C. Не замораживать.

При условии сохранности упаковки все компоненты тест-системы сохраняют годность в течение указанного срока хранения.

Утилизация использованных расходных материалов: Образцы крови и сыворотки пациента, калибровочные растворы, контрольные растворы, ряды ячеек после инкубации следует обрабатывать как инфекционный материал. Все растворы следует утилизировать согласно официальным инструкциям.

Подготовка и обеспечение сохранности реагентов

Примечание: Перед использованием все реагенты следует оставить при комнатной температуре (от +18°C до +25°C) в течение около 30 минут. Если ниже не указано иное, после первого использования срок годности реагентов соответствует указанному на упаковке при хранении при температуре от +2°C до +8°C и обеспечении защиты от загрязнения.

Термостат следует настроить на температуру 37° ± 1°C.

- **Ячейки, покрытые антигенами:** Готовы для применения Надорвите запечатываемую защитную упаковку плашки в уголке выше зажимающей застёжки. Не открывайте плашку до прогревания до комнатной температуры во избежание запотевания отдельных ячеек. После частичного использования немедленно закройте оставшиеся ряды ячеек защитной упаковкой и плотно зажмите находящейся на ней застёжкой (не удаляйте мешочек с влагопоглотителем).
После первого вскрытия защитной упаковки допускается хранение ячеек, покрытых антигеном, в сухом месте и при температуре от +2°C до +8°C не менее 4 месяцев.
- **Калибровочный и контрольные растворы:** Готовы для применения. Перед использованием реагенты следует тщательно перемешать.
- **Ферментный конъюгат:** Готов для применения. Перед использованием ферментный конъюгат следует тщательно перемешать.
- **Буфер для обработки образца:** Готов для применения.
- **Буфер для промывания:** буфер для промывания представляет собой концентрированный в 10 раз раствор. Если в концентрированном буфере произошла кристаллизация, перед разведением следует подогреть его до 37°C и тщательно перемешать. Необходимое для работы количество раствора следует забрать из бутылки с помощью чистой пипетки и развести деионизированной или дистиллированной водой (1 объемную часть реагента — 9 частями дистиллированной воды).
Например, для 1 плашки: 5 мл концентрата плюс 45 мл воды.
Годность готового для использования разведенного буфера для промывания сохраняется в течение 1 месяца при хранении при температуре от +2°C до +8°C и соблюдении правил хранения.
- **Хромоген / раствор субстрата:** Готов для применения. Бутыль следует закрывать немедленно после использования, поскольку ее содержимое чувствительно к свету. Хромоген / раствор субстрата при использовании должен быть прозрачным. Не

используйте раствор, если он приобрел голубой цвет.

– **Раствор для прерывания реакции:** Готов для применения.

Предостережение: Отсутствие HBsAg, антител к HCV, ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в использованных контрольных сыворотках показано с использованием методов иммуноферментного анализа и непрямой иммунофлуоресценции. Тем не менее, все материалы следует считать потенциально инфицированными и обрабатывать с осторожностью. Ряд реагентов содержат токсическое вещество азид натрия. Следует избегать их попадания на кожу.

Подготовка и обеспечение сохранности образцов крови пациентов

Образцы плазмы и сыворотки крови: Сыворотка крови человека или плазма крови, обработанная ЭДТА, гепарином или цитратом.

Обеспечение сохранности: Образцы для исследования следует хранить при температуре от +2°C до +8°C не более 14 суток.

Разведенные образцы следует инкубировать в течение 1 рабочего дня.

Разведение образцов: Образцы плазмы или сыворотки крови пациентов разводят буфером для обработки образцов в отношении **1: 101**. Например: развести 10 мкл сыворотки 1,0 мл буфера для обработки образцов и тщательно перемешать (специальные пипетки для перемешивания в комплект не входят).

Примечание: Калибровочный и контрольные растворы поставляются в разведенном виде, готовыми к использованию; их разводить не следует.

Инкубация

Инкубация образцов плазмы и сыворотки крови: (1. этап)

Перенесите 100 мкл калибровочного раствора, положительный и отрицательный контроли либо разведенные образцы плазмы или сыворотки пациента в отдельные ячейки на плашке в соответствии с протоколом раскапывания.

Для ручной обработки ячеек покройте плашку, подготовленную к исследованию, защитной фольгой. При инкубации с помощью автоматизированного процессора следуйте рекомендациям его изготовителя в отношении герметизации плашек.

Инкубируйте **60 минут при температуре 37°C ± 1°C**.

Промывание:

Ручное: Удалите защитную фольгу, опорожните ячейки, затем трехкратно промойте их с помощью 300 мкл (на каждое промывание) разведенного буфера для промывания.

Автоматическое: Промойте ячейки 3 раза с помощью 400 мкл разведенного раствора для промывания (установка программы: например, для аппарата TECAN Columbus Washer включите режим “Overflow Modus”).

Буфер для промывания инкубируйте в каждой плашке в течение 30–60 секунд на каждый цикл промывания, затем опорожните плашки. После промывания (ручного или автоматического) тщательно удалите оставшуюся жидкость из плашки с помощью промокательной бумаги, наклонив отверстия ячеек вниз, чтобы удалить остатки буфера.

Примечание: Сохраняющаяся в ячейках после промывания

жидкость (> 10 мкл) может взаимодействовать с субстратом и вызывать снижение показателя экстинкции. Недостаточное промывание (например, менее 3 циклов промывания, недостаточный объем буфера для промывания, недостаточное время промывания) может привести к завышению показателя экстинкции.

Инкубация конъюгатом:
(2. этап)

С помощью пипетки внесите по 100 мкл ферментного конъюгата (антител к IgG человека, меченых пероксидазой) в каждую ячейку плашки.

Для ручной обработки ячеек покройте плашку, подготовленную к исследованию, новым листом защитной фольги. При инкубации с помощью автоматизированного процессора следуйте рекомендациям его изготовителя в отношении герметизации плашек.

Инкубируйте **60 минут при температуре 37°C ± 1°C**.

Промывание:

Удалите защитную фольгу и опорожните плашки. Промойте их, как описано выше.

Инкубация субстратом:
(3. этап)

С помощью пипетки внесите в каждую ячейку по 100 мкл хромогена / раствора субстрата. Покройте новым листом защитной фольги и инкубируйте **15 минут при комнатной температуре** (от +18°C до 25°C), не на свету!

Прерывание реакции:

Удалите защитную фольгу и с помощью пипетки внесите 100 мкл раствора для прерывания реакции в каждую ячейку в том же порядке и с той же скоростью, что и при внесении хромогена / раствора субстрата.

Измерение:

Фотометрическое измерение интенсивности окраски следует проводить на длине волны 450 нм и при длине опорной волны 620–650 нм **в течение 30 минут после добавления раствора для прерывания реакции**. Перед проведением измерения слегка взболтайте плашку, чтобы обеспечить равномерное распределение раствора.

Протокол раскапывания

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	P 6	P 14	P 22								
B	pos.	P 7	P 15	P 23								
C	neg.	P 8	P 16	P 24								
D	P 1	P 9	P 17									
E	P 2	P 10	P 18									
F	P 3	P 11	P 19									
G	P 4	P 12	P 20									
H	P 5	P 13	P 21									

Выше приведен примерный протокол раскапывания для полуколичественного анализа антител на 24 образца (P1 — 24) плазмы или сыворотки крови.

Калибровочный раствор (C), положительный (pos.) и отрицательный (neg.) контрольные растворы, а также образцы плазмы или сыворотки крови пациентов помещали каждый в отдельную ячейку. Надежность ИФА можно повысить, если исследование каждого образца проводить двукратно.

Отдельные ячейки можно отламывать от плашки. Это позволяет привести расход субстрата в соответствие с количеством исследуемых образцов, и тем самым минимизировать расход реагентов.

Положительные и отрицательные контроли позволяют в качестве внутреннего контроля проверить надежность результатов исследования. Их следует использовать при каждом исследовании.

Расчет результатов исследования

EUROIMMUN рекомендуется в качестве **верхнего предела** уровня экстинкции для неинфицированных лиц использовать показатель экстинкции калибровочной сыворотки.

Полуколичественный анализ: Результаты можно оценить полуколичественно, рассчитав отношение показателя экстинкции контрольной или исследуемой плазмы или сыворотки к показателю калибровочной сыворотки. Расчет проводят по следующей формуле:

Компания EUROIMMUN рекомендует оценивать результаты следующим образом:

$$\frac{\text{Экстинкция контрольной или исследуемой сыворотки}}{\text{Экстинкция калибровочной сыворотки}} = \text{Отношение}$$

Отношение < 1.0:	отрицательный
Отношение от 1.0 до <1.5:	пограничный
Отношение 1.5:	положительный

Результат для сывороток с отношением 1,0–1,5 следует считать пограничным. Мы рекомендуем повторно исследовать эти сыворотки с помощью других тест-систем, например, непрямой иммунофлуоресценции (IIFT) или ПЦР. Кроме того, следует проверить соблюдение протокола титрования. (EUROIMMUN anti-SARS-CoV IIFT, например, номер по каталогу: FI 2601-1005; EUROIMMUN RT-PCR для непосредственного выявления SARS-CoV, например, номер по каталогу: MI 2601-9601)

Для повторных определений следует брать среднее значение результатов. Если результаты двух исследований значительно различаются, образец нужно исследовать повторно.

Для установления диагноза во всех случаях следует, кроме серологических, учитывать клинические данные.

Показатели тест-системы

Калибровка: Поскольку сыворотки с антителами класса IgG против SARSCoV, получившей международное признание, не существует, результаты приводятся в виде отношения, которое позволяет оценить концентрацию антител.

Для каждой группы проведенных исследований показатели экстинкции для калибровочной сыворотки, положительных и отрицательных контролей должны находиться в пределах, указанных для соответствующей серии тест-системы. Протокол с указанием этих пределов прилагается. Если показатели для контрольных сывороток не достигнуты, результаты исследования могут оказаться ложными, и исследование следует повторить.

Активность использованного фермента зависит от температуры, поэтому в отсутствие

инкубации в термостате могут быть получены различные показатели экстинкции. Чем выше температура во время инкубации с субстратом, тем выше окажется показатель экстинкции. Аналогичные различия наблюдаются также для времени проведения реакции. Однако калибровочные растворы также подвергаются этим воздействиям, поэтому их использование позволяет в значительной мере компенсировать эти воздействия при расчете результатов.

Антиген: В тест-системе использован антиген лизата вируса SARS-CoV, очищенный ультрацентрифугированием с экстракцией детергентом. Он был приготовлен в сотрудничестве с институтом Роберта Коха, Берлин, Германия. Изолят вируса был любезно предоставлен Институтом Медицинской Вирусологии, Университет Иоганна Вольфганга Гете, Франкфурт, Германия.

Антиген был инактивирован высокой температурой и гамма-излучением. Эффективность инактивации проверена с помощью культивирования, при котором роста не выявлено.

Неблагоприятное воздействие: Неблагоприятного воздействия не было отмечено при гемолизе до концентрации гемоглобина 10 мг/мл и при желтухе до концентрации билирубина 0,4 мг/мл.

Воспроизводимость результатов: Воспроизводимость результатов исследования изучали по коэффициенту вариации (КВ) результатов, полученных на различных точках калибровочной кривой, для внутренних и внешних контролей при исследовании 3 сывороток. Для внутренних контролей при 20 исследованиях и для внешних контролей при 4 исследованиях, проведенных в течение 6 различных дней, получены следующие КВ:

Вариация для внутренних контролей, n=20		
Сыворотка	Среднее значение (Отношение)	КВ (%)
1	1.3	7.5
2	4.0	5.9
1	7.1	3.7

Вариация для внешних контролей, n= 4 * 6		
Сыворотка	Среднее значение (Отношение)	КВ (%)
1	1.3	5.7
2	3.8	4.7
3	7.2	3.5

Специфичность и пределы уровня экстинкции С помощью тест-системы для иммуноферментного анализа EUROIMMUN ELISA были исследованы образцы сыворотки 92 пациентов с инфекцией другими вирусами в высоком титре. В 90 образцах (97,8%) антитела к SARS-CoV не выявлены (отношение < 1,0), в 1 образце (1,1%) антитела к SARS-CoV оказались на пограничном уровне (отношение 1,0—1,5), и в 1 образце (1,1%) антитела к SARS-CoV были положительными (отношение >1,5).

Уровень антител к SARS-CoV исследовали с помощью EUROIMMUN ELISA в двух группах клинически здоровых доноров крови (немцев, n=402; китайцев, n=97). В 400 образцах (99,5%) крови доноров-немцев антитела к SARS-CoV не выявлены (отношение < 1,0), в 1 образце (0,25%) крови донора-немца антитела к SARS-CoV оказались на пограничном уровне (отношение 1,0—1,5), и в 1 образце (0,25%) крови донора-немца антитела к SARS-CoV были положительными (отношение >1,5). Во всех 97 образцах крови доноров-китайцев результаты исследования были отрицательными.

Клиническая чувствительность: Сыворотку крови 34 пациентов с клинически диагностированным SARS исследовали с помощью тест-систем EUROIMMUN: ПЦР с

обратной транскриптазой, непрямой иммунофлуоресценции (ИIFT) и ИФА. Образцы получали через 1–54 суток после развития клинических проявлений. Все сыворотки от 34 больных SARS (100%) оказались положительными при ПЦР с обратной транскриптазой или исследовании антител.

Из 12 пациентов, клинические проявления у которых развились менее, чем за 10 суток до исследования, результаты ПЦР были положительны в 12 случаях, а результаты ИIFT и ИФА — в 2 случаях.

Из 22 пациентов, заболевших за 10 и более суток до исследования, результаты ИФА на наличие антител к SARS-CoV оказались положительными в 21 случае (95,4%). Результаты для 18 образцов сыворотки были признаны положительными, для 3 образцов — пограничными, поэтому эти сыворотки следует исследовать другими методами. При ИIFT результаты для всех 21 сывороток были признаны положительными. При ПЦР с обратной транскриптазой положительная реакция отмечена для 10 сывороток. Отдельные сыворотки, для которых определение антител было неэффективным, оказались положительными при использовании ПЦР с обратной транскриптазой.

Специфичность и чувствительность: Чувствительность и специфичность ИIFT и ИФА совпали в 100% случаев.

Подробные данные исследования приведены в таблице ниже.

n = 34		Антитела к SARS-CoV ИIFT (IgG) EUROIMMUN	
		положительный	отрицательный
Антитела к SARS-CoV ИФА (IgG) EUROIMMUN	положительный	20	0
	пограничный	3	0
	отрицательный	0	11

Результаты для трех сывороток были признаны пограничными, поэтому при расчете чувствительности и специфичности их не учитывали.

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/>)