

RIDASCREEN® Hantavirus Puumala IgG, IgM

REF K9221
K9231



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany
(Германия)

Тел.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / факс: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Назначение

Для диагностики *in vitro*. Тесты RIDASCREEN® Hantavirus Puumala являются иммуноферментными анализами для количественного определения антител IgG или IgM к Hantavirus Puumala в сыворотке человека.

Тесты предназначены для использования только в случаях подозрения на хантавирусную инфекцию.

2. Краткое описание теста

Таксономически хантавирус относится к бунтавирусам. Это РНК-содержащий вирус. Одноцепочечная РНК присутствует в трех кольцевидных сегментах (1,2). Хантавирусы встречаются во всем мире. Тем не менее, существует географическое распределение для отдельных видов ханты с учетом серотип-специфических хозяев-резервуаров. Виды Puumala и Dobrava-Belgrade, а также Hantaan распространены в Евразии (3). Резервуаром патогенных микроорганизмов являются постоянно и бессимптомно зараженные грызуны, такие как мыши, которые выделяют большие количества патогенных микроорганизмов через мочу, фекалии и слюну. Патогенные микроорганизмы передаются людям через контактную инфекцию или путем вдыхания аэрозоля с содержанием фекалий или мочи (1). В дополнение к безвредным симптомам гриппа, заражение хантавирусом может вызвать геморрагический нефрозонефрит (эпидемию нефропатии, HFRS) или поражение легких (хантавирусный легочный синдром (HPS)). Летальность зависит непосредственно от штамма вируса и тяжести инфекции (4.5). Гуморальный иммунный ответ в первую очередь направлен против нуклеокапсидного антигена хантавируса. Используя чувствительные методы обнаружения, антитела IgM могут быть обнаружены при первоначальном проявлении клинических симптомов. Как правило, можно обнаружить антитела IgG через две недели после заражения (5).

3. Принцип действия теста

Рекомбинантный белок NEV-N хантавируса видов Puumala связан с поверхностью лунок в микротитровальных полосках. Разбавленные образцы пациентов, а также контрольные образцы добавляют пипеткой в данные лунки и выполняют инкубацию при 37 °С. Существующие антитела связываются с иммобилизованными антигенами. Несвязанный материал удаляется путем промывки.

Затем добавляют конъюгированное с пероксидазой античеловеческое антитело (анти-IgG или анти-IgM). Весь несвязанный конъюгат удаляется путем промывки. Затем добавляют субстрат (H₂O₂/ТМБ), что приводит к образованию синего цвета для положительных образцов под воздействием связанного фермента. Эту реакцию прекращают добавлением стоп-реагента. Такое добавление приводит к изменению цвета с синего на желтый. Окончательное измерение проводят в фотометре при 450 нм (эталонная длина волны 620 нм) в течение 20 минут.

4. Предоставленные реагенты

Табл. 1: Предоставленные реагенты (набор реагентов, достаточный для проведения 96 опытов)

			K9221 IgG	K9231 IgM
Plate	96 анализов	Микротитровальная пластина; 12 микротитровальных полосок (разрывные) в раме; покрытые антигеном хантавируса	X	X
SeroPP <i>Прозрачная крышка</i>	110 мл	Буфер для разведения проб, готовый к использованию; фосфатно-буферный солевой раствор, окрашенный в желтый цвет	X	X
SeroWP	100 мл	Промывочный буфер, концентрация 10X, трис-буферный солевой раствор	X	X
Control IgG + <i>Зеленая крышка</i>	2,5 мл	Стандартный контроль IgG, готовый к использованию; разведенная сыворотка человека, окрашенная в зеленый цвет	X	
Control IgM + <i>Красная крышка</i>	2,5 мл	Стандартный контроль IgM, готовый к использованию; разведенная сыворотка человека, окрашенная в красный цвет		X
Control IgG - <i>Прозрачная крышка</i>	1,2 мл	Негативный контроль IgG, готовый к использованию; разведенная сыворотка человека	X	
Control IgM - <i>Прозрачная крышка</i>	1,2 мл	Негативный контроль IgM, готовый к использованию; разведенная сыворотка человека		X
Control IgG A <i>Зеленая крышка</i>	1,2 мл	Контроль качества A IgG, готовый к использованию; разведенная сыворотка человека, окрашенная в зеленый цвет	X	
Control IgG B <i>Зеленая крышка</i>	1,2 мл	Контроль качества B IgG, готовый к использованию; разведенная сыворотка человека, окрашенная в зеленый цвет	X	
Control IgM A <i>Красная крышка</i>	1,2 мл	Контроль качества A IgM, готовый к использованию; разведенная сыворотка человека, окрашенная в красный цвет		X
Control IgM B <i>Красная крышка</i>	1,2 мл	Контроль качества B IgM, готовый к использованию; разведенная сыворотка человека, окрашенная в красный цвет		X

SeroG LD <i>Зеленая крышка</i>	12 мл	Античеловеческий IgG конъюгат LD (козий), готовый к использованию; конъюгированные с пероксидазой антитела в стабилизированном белковом растворе	X	
SeroM LD <i>Красная крышка</i>	12 мл	Античеловеческий IgM конъюгат LD (козий), готовый к использованию; конъюгированные с пероксидазой антитела в стабилизированном белковом растворе		X
SeroSC	12 мл	Субстрат H ₂ O ₂ /тетраметилбензидин; готовый к использованию	X	X
Stop	12 мл	Стоп-реагент 1 N серная кислота; готовый к использованию	X	X

Информация об опасных веществах соответствует требованиям к маркировке. Для получения дополнительной информации см. паспорта безопасности продуктов (SDS) и информацию о продукте на веб-сайте www.r-biopharm.com.

5. Инструкции по хранению

Тестовый набор может использоваться до даты истечения срока действия, указанной на этикетке в случае хранения при температуре 2 - 8 °С.

Разведенный промывочный буфер может храниться не более четырех недель при температуре 2 - 8 °С и в течение одной недели в случае хранения при комнатной температуре (20 - 25 °С). После истечения срока годности конечное качество результата не гарантируется.

Откройте алюминиевый пакет с микротитровальной пластиной, не отделяя зажимное уплотнение. Немедленно поместите любые ненужные микротитровальные полоски в герметичный алюминиевый пакет при температуре 2 - 8 °С.

Загрязнение реагентов недопустимо, предотвратите воздействие прямого света на бесцветный субстрат.

6. Необходимые, но не предоставленные реагенты

6.1. Реагенты

- Дистиллированная или деионизированная вода
- RF-Absorbens для опытов IgM (такие как RIDA[®] RF-Absorbens, № арт. Z0202)

6.2. Аксессуары

- Вials для образцов
- Инкубатор 37 °C
- Вихревая мешалка
- Микропипетки с объемом 10 - 100 мкл и 100 - 1000 мкл
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Мойка для микротитровальных пластин или многоканальных пипеток
- Фотометр для микротитровальных пластин (450 нм, контрольный фильтр \geq 620 нм)
- Фильтровальная бумага (лабораторные салфетки)
- Контейнер для отходов с 0,5% раствором гипохлорита

7. Предупреждения и меры предосторожности для пользователей

Только для диагностики *in vitro*.

Данный тест должен выполнять только обученный лабораторный персонал. Соблюдайте рекомендации по работе в медицинских лабораториях. Для выполнения данного теста необходимо строго соблюдать инструкции по использованию. Не допускайте попадания проб или реагентов в рот. Избегайте контакта с поврежденной кожей или слизистыми оболочками. Во время работы с реагентами или пробами используйте средства индивидуальной защиты (соответствующие перчатки, лабораторный халат, защитные очки) и мойте руки после завершения теста. Не курите, не ешьте и не пейте в зонах, где ведется работа с пробами.

Для получения дополнительной информации см. паспорта безопасности продуктов (SDS) на веб-сайте www.r-biopharm.com.

Пользователи несут ответственность за надлежащую утилизацию всех реагентов и материалов после использования. Соблюдайте соответствующие национальные правила утилизации.

Контрольные сыворотки, включенные в набор (стандартный контроль, негативный контроль, контроль качества A и B), были протестированы на HIV Ab, HCV Ab и HBsAg и показали отрицательный результат. Тем не менее, их следует рассматривать как потенциально инфекционные, также как и образцы пациентов и все материалы, которых вы касаетесь; их следует обрабатывать в соответствии с применимыми национальными правилами безопасности.

8. Забор и хранение образцов

Данный тест был разработан для исследования образцов сыворотки человека. После забора образца крови необходимо как можно быстрее отделить сыворотку от коагулята, чтобы предотвратить гемолиз. Образцы следует хранить холодным или замороженным до проведения теста. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также загрязнения микроорганизмами. Использование инактивированных в результате высокой температуры, липемических, гемолитических, желтушных или непрозрачных образцов может привести к искажению результатов.

Табл. 2: Хранение образцов

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2 - 8 °C	-20 °C	2 - 8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. Порядок проведения теста

9.1. Общие сведения

Перед использованием подождите, пока все реагенты и микротитровальные полоски не нагреются до комнатной температуры (20 - 25 °C). Как только они достигнут комнатной температуры, удалите микротитровальные полоски из алюминиевого пакета. Тщательно смешайте реагенты непосредственно перед использованием. После использования сразу же поместите набор на хранение при 2 - 8 °C.

Возьмите столько реагентов, сколько необходимо для проведения теста. Не возвращайте лишние реагенты в контейнер, так как это может привести к загрязнению.

Микротитровальные полоски можно использовать только один раз. Не используйте реагенты или микротитровальные полоски, если упаковка повреждена или контейнеры закрыты не плотно.

Некоторые из реагентов в наборе не предназначены для проведения конкретного теста. Реагенты, обозначенные Sero (например, SeroPP), можно также использовать для других RIDASCREEN® Sero ELISA с соответствующими реагентами.

Контрольные сыворотки относятся к определенной партии. Обмен контрольных сывороток между наборами с разными номерами партий не допустим.

Контроль качества А и В RIDASCREEN® Sero ELISA предложен в качестве дополнительных определенных контрольных образцов в соответствующем тестовом наборе RIDASCREEN® Sero ELISA. Эти контрольные образцы предназначены для дополнительной гарантии качества и могут быть использованы при желании. Они содержат контрольную сыворотку человека с различными концентрациями антител.

9.2. Подготовка промывочного буфера

Смешайте 1 часть концентрата промывочного буфера **SeroWP** с 9 частями дистиллированной воды. Для этого добавьте 100 мл концентрата в цилиндр объемом 1000 мл и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой. Любые кристаллы, присутствующие в концентрате, следует предварительно растворить при нагревании (водяная баня 37 °С). Разведенный промывочный буфер может храниться не более четырех недель при температуре 2 - 8 °С и в течение пяти дней в случае хранения при комнатной температуре (20 - 25 °С).

9.3. Подготовка образцов

Перед началом теста разбавьте образцы сыворотки буфером для разведения проб **SeroPP**. Обратите внимание, что разведения различны для IgG и IgM.

IgG :1:200 разбавление образцов сыворотки

Например: 10 мкл сыворотки + 1990 мкл **SeroPP**

IgM :1:100 разбавление образцов сыворотки

Например: 10 мкл сыворотки + 990 мкл **SeroPP**

Для опытов IgM рекомендуется провести поглощение IgG сыворотки (например, с помощью RIDA® RF-Absorbens, № арт. Z0202) перед проведением тестов.

Внимание!

Негативный контроль, стандартный контроль и контроль качества А и В готовы к использованию и для них недопустимо проведение разбавления или поглощения.

9.4. Первая инкубация

После того как достаточное количество лунок поместили в раму, добавьте с помощью пипетки по 100 мкл каждой разведенной сыворотки и готовых к использованию контрольных образцов в соответствующие лунки; позиция A1 (значение для холостой пробы субстрата) остается пустой. Добавляют негативный контроль или выполняют один раз,

а позитивный контроль или — два раза. Добавляют контроль качества и или контроль качества и один раз. Выполняют инкубацию пластины в инкубаторе в течение 30 минут при температуре 37 °С. Дно лунок не должно касаться материалов, которые легко проводят тепло. Накройте микротитровальную пластину во время инкубации.

Используйте соответствующие контроли (IgG или IgM).

A1	Значение для холостой пробы реагента
B1	Негативный контроль
C1	Стандартный контроль
D1	Стандартный контроль
E1	Контроль качества А
F1	Контроль качества В
G1	Разведенная сыворотка пациента

Внимание!

Не помещайте микротитровальную пластину в холодный контейнер инкубатора, который нагревается до 37 °С во время инкубации. Контейнер должен быть предварительно нагрет до 37 °С.

9.5. Промывка

Опорожните лунки в контейнер для отходов, в котором находится раствор гипохлорита для дезинфекции. Затем приложите к пластине абсорбирующую бумагу, чтобы удалить оставшуюся влагу. Далее промойте пластину 4 раза, каждый раз с использованием 300 мкл промывочного буфера. После каждой промывки коснитесь пластины неиспользованным участком бумаги, чтобы обеспечить полное опорожнение.

В случае использования устройства для мойки микропланшетов, убедитесь, что прибор правильно установлен на тип пластины. После мойки приложите к пластине чистую абсорбирующую бумагу, чтобы удалить оставшуюся влагу.

9.6. Вторая инкубация

Добавьте 100 мкл античеловеческого IgG конъюгата LD **SeroG LD** или античеловеческого IgM конъюгата LD **SeroM LD** в соответствующие лунки (включая A1). Затем выполните инкубацию пластины в инкубаторе в течение 30 минут при температуре 37 °С (см. пункт 9.4).

9.7. Промывка

Выполните промывку четыре раза, как описано в пункте 9.5.

9.8. Третья инкубация

Добавьте 100 мкл субстрата **SeroSC** в каждую лунку. Затем выполните инкубацию пластины в инкубаторе в течение 30 минут при температуре 37 °С. После этого добавьте 100 мкл стоп-реагента **Stop** каждую лунку для остановки реакции. После смешивания пластины (осторожно нажимая на край пластины) будет измерен коэффициент экстинкции с помощью фотометра для пластин при 450 нм (контрольная длина волны ≥ 620 нм). Выполните измерение в течение 20 минут после остановки. Регулировку значения для холостой пробы выполняют на основании значения для холостой пробы реагента (позиция A1).

10. Контроль качества: признаки нестабильности или истечения срока годности реагентов

Для контроля качества каждый раз при выполнении теста необходимо провести стандартный контроль (дважды) и негативный контроль. Тест был выполнен правильно, если среднее значение коэффициента экстинкции стандартного контроля 450/620 нм находится в диапазоне, указанном в сертификате качества для конкретной партии. Если два отдельных измерения более чем на 20 % отличаются от среднего значения, испытание необходимо повторить. Для негативного контроля значение коэффициента экстинкции должно составлять $< 0,3$ при 450/620 нм.

Контроль качества A и B RIDASCREEN® Sero ELISA — контрольные образцы для дополнительной гарантии качества, которые могут быть использованы при желании. Целевой диапазон представлен в прилагаемом сертификате качества для определенной партии. Индивидуальные значения (ед./мл, МЕ/мл или мМЕ/мл) являются ориентировочными значениями для пользователя для внутреннего контроля качества в лаборатории.

Отклонение от ожидаемых значений, а также мутность или синяя окраска субстрата перед добавлением в лунки может быть признаком истечения срока годности реагента.

Если указанные значения не получены, перед повторением теста проверьте следующее:

- срок годности используемых реагентов;
- функциональность используемого оборудования (например, калибровку);
- правильность проведения теста;
- визуальный осмотр компонентов набора на наличие загрязнения или утечек; запрещается использовать раствор субстрата синего цвета.

Если условия снова не выполняются после повторения теста, свяжитесь с изготовителем.

11. Оценка и интерпретация

Тесты можно оценить тремя различными способами:

1. с помощью предоставленной стандартной кривой;
2. с помощью таблицы значений (см. предоставленный паспорт безопасности продукта);
3. математически с помощью модели с 4 параметрами или метода α .

Значение для холостой пробы реагента необходимо вычесть из всех значений коэффициента экстинкции перед оценкой.

11.1. Оценка с использованием стандартной кривой

Для оценки с использованием стандартной кривой необходимо скорректировать ежедневное отклонение путем использования среднего значения стандартного контроля. Коэффициент коррекции F вычисляют с помощью целевого значения для стандартного контроля и текущего измеренного значения контроля.

Используйте зависимое от партии целевое значение, указанное в приложенном сертификате качества.

$$F = \frac{\text{Целевого значения для стандартного контроля}}{\text{Значение коэффициента экстинкции для стандартного контроля}}$$

Умножьте все значения оптической плотности (OD) образца на коэффициент F. Соответствующее значение в ед./мл получают на стандартной кривой, используя эти скорректированные значения.

11.2. Оценка с использованием таблицы значений

В таблице значений среднее значение коэффициента экстинкции для стандартного контроля определяют в столбце с диапазоном значений, применимых к текущему измерению. В данном столбце измеренное значение коэффициента экстинкции образца связано с соответствующим диапазоном экстинкции, а соответствующий титр в ед./мл находят во втором столбце слева. Например, среднее значение коэффициента экстинкции для стандартного контроля в измерении составляет 0,91. В этом случае для определения результата используют столбец в таблице с диапазоном от 0,89 до 0,94. То есть образец пациента со значением экстинкции 0,61 находится в диапазоне от 2,01 до 35,0 ед./мл. (Вышеуказанные значения приведены в качестве примера и могут отличаться от текущих значений в паспорте безопасности продукта.)

Оценка полученных результатов - положительный (+), отрицательный (-) или пограничный (?) - представлена в первом столбце таблицы значений.

Рис. 1: Пример определения IgG (за исключением определенного для партии паспорта безопасности продукта)

	ед./мл	Диапазон значений для стандартного контроля			
				0,89 - 0,94	
-	< 16,0			< 0,49	
?	16,0 - 20,0			0,49 - 0,56	
+	20,1 - 35,0			0,57 - 0,85	
	35,1 - 60,0			0,86 - 1,20	
	60,1 - 100,0			1,21 - 1,55	
	100,1 - 150,0			1,56 - 1,81	
	150,1 - 400,0			1,82 - 2,39	
	> 400,0			> 2,39	

11.3. Математическая оценка

Необходимые значения для математической оценки с помощью модели с 4 параметрами или метода α представлены в приложенном паспорте безопасности продукта.

11.4. Оценка и интерпретация

Табл. 3: Оценка найденных единиц

	Отрицательный результат	Пограничный результат	Положительный результат
IgG	< 16	16 - 20	> 20
IgM	< 16	16 - 20	> 20

12. Ограничения метода

RIDASCREEN® Hantavirus Puumala выполняет количественное определение антител IgG или IgM к Hantavirus Puumala. Тест предназначен для использования только в случаях подозрения на хантавирусную инфекцию. Результаты теста всегда следует интерпретировать в контексте клинической картины и других диагностических данных. Развитие антител может отличаться в зависимости от пациента с точки зрения времени и концентрации. Отрицательный результат не исключает хантавирусную инфекцию, так как стадия инфекции может быть очень ранней, или подвиды могут быть разными. Если клинические подозрения не исключены, тест следует повторить через несколько дней. В зависимости от географического происхождения пациента рекомендуется одновременно проверить его на инфекцию с другим штаммом хантавируса, например, Dobrava/Hantaan. Положительный результат теста не исключает наличия других инфекционных патогенных микроорганизмов.

13. Рабочие характеристики

Табл. 5: Отклонения между анализами (n = 30)

Отклонения между анализами	IgG		IgM	
	ед./мл	КИ	ед./мл	КИ
Сыворотка 1	81,71	13,6 %	75,84	13,1 %
Сыворотка 2	43,03	25,9 %	49,04	12,8 %
Сыворотка 3	64,43	17,7 %	101,67	19,5 %
Сыворотка 4	5,87	нет данных	1,52	нет данных

Табл. 6: Отклонения в пределах анализа (n = 23)

Отклонения в пределах анализа	IgG		IgM	
	ед./мл	КИ	ед./мл	КИ
Сыворотка 1	98,57	11,6 %	74,64	5,2 %
Сыворотка 2	25,30	6,8 %	42,62	10,3 %
Сыворотка 3	34,68	6,5 %	75,87	13,6 %
Сыворотка 4	4,48	нет данных	1,35	нет данных

Табл. 7, 8: Клиническая эффективность по сравнению с другими коммерческими ELISA

IgG		Конкурент			
		Положительный результат	Пограничный результат	Отрицательный результат	Итого
R-Biopharm	Положительный результат	10	3	0	13
	Пограничный результат	2	1	0	3
	Отрицательный результат	8*	15	43	66
	Итого	20	19	43	82

Совпадение положительных результатов: 55,6* %

Совпадение отрицательных результатов: 100 %

*Расхождение между результатами (положительный у конкурента и отрицательный у R-Biopharm) было проверено с использованием контрольного теста (LineBlot), который показал отрицательный результат.

IgM		Конкуренент			
		Положительный результат	Пограничный результат	Отрицательный результат	Итого
R-Viоrpharm	Положительный результат	10	2	6	18
	Пограничный результат	0	1	6	7
	Отрицательный результат	0	3	54	57
	Итого	10	6	66	82

Совпадение положительных результатов: 100 %

Совпадение отрицательных результатов: 90 %

Табл. 9: Результаты 200 проверенных доноров крови из центра донорства крови в Германии










200 образцов сыворотки донорской крови	IgG	IgM
Отрицательный результат	99,0 %	96,5 %
Пограничный результат	0,5 %	1,0 %
Положительный результат	0,5 %	2,5 %

14. История версий

Номер версии	Раздел и название
2018-02-01	Выпущенная версия

15. Условные обозначения

Общие обозначения

-  Диагностика in vitro
-  Соблюдайте инструкции по использованию
-  Номер партии
-  Срок годности
-  Температура хранения
-  Номенклатурный номер
-  Количество тестов
-  Дата изготовления
-  Изготовитель

Условные обозначения, относящиеся к тесту

Plate	Микротитровальная пластина
SeroPP	Буфер для разведения проб
SeroWP	Промывочный буфер 10x
Control IgG +	Стандартный контроль IgG
Control IgM +	Стандартный контроль IgM
Control IgG -	Негативный контроль IgG
Control IgM -	Негативный контроль IgM
Control IgG A	Контроль качества A IgG
Control IgM A	Контроль качества A IgM
Control IgG B	Контроль качества B IgG
Control IgM B	Контроль качества B IgM
SeroG LD	Античеловеческий IgG конъюгат
SeroM LD	Античеловеческий IgM конъюгат
SeroSC	Субстрат ТМБ
Stop	Стоп-реагент

16. Исползованная литература

1. *Ulrich R, Meisel H, Schütt M, Schmidt J, Kunz A, Klempa B, u. a.* Verbreitung von Hantavirusinfektionen in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz [Internet]. Juli 2004 [zitiert 23. Mai 2017];47(7). Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/s00103-004-0858-8>
2. *Hahn H, Kaufmann SH, Schulz TF, Suerbaum S, Adler K, Schad D, u. a.* Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag; 2009.
3. *Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O.* A global perspective on hantavirus ecology, epi-demiology, and disease. Clin Microbiol Rev. 2010;23(2):412–41.
4. *Peters MD, Simpson MD, Levy MD.* Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. Annu Rev Med. 1999;50(1):531–45.
5. *Martens H.* Serologische Untersuchungen zur Prävalenz und zum Verlauf von Hantavirus-Infektionen in Mecklenburg-Vorpommern. Gesundheitswesen. 2000;62(02):71–7.