

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления антигенов вируса клещевого энцефалита и антител к нему методом иммуноферментного анализа

«Биоскрин-КЭ»

(комплект AG)

ФСР

Е-1155
Биоскрин-КЭ
комплект AG

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект «AG» набора реагентов «БиоСкрин-КЭ» предназначен для выявления антигенов вируса клещевого энцефалита (КЭ) в полевых и клинических материалах: иксодовых клещах, органах погибших людей, органах позвоночных животных.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

На поверхности лунок полистиролового планшета иммобилизованы в лунках рядов №№ 1, 3, 5, 7, 9, 11 поликлональные мышинные иммуноглобулины класса G против вируса КЭ (С-лунки) и в лунках рядов №№ 2, 4, 6, 8, 10, 12 иммуноглобулины, полученные от неиммунизированных мышей (К-лунки). Каждый образец тестируется в двух параллельных лунках. Если в исследуемом образце присутствуют вирусные антигены, то при инкубации произойдет их связывание с IgG-антителами против вируса КЭ в С-лунках, в К-лунках связывания специфических антител не происходит. После отмывания вносят конъюгат, представляющий собой мышинные поликлональные антитела к вирусу КЭ, меченные пероксидазой хрена. После удаления несвязанных молекул конъюгата в лунки планшета добавляют индикаторный раствор, включающий субстрат и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Ферментативная реакция пероксидазы с хромогеном приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации антигенов вируса КЭ в образце. После остановки реакции стоп-реагентом интенсивность окрашивания раствора измеряют на спектрофотометре по оптическому поглощению при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм).

2.2. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят следующие компоненты, упакованные в коробку:

Компонент	Описание	Количество
Иммуносорбент	Разборный полистироловый 96-луночный планшет для иммунологических реакций с прозрачным плоским дном лунок	2 шт.
Положительный контрольный образец инактивированный К ⁺ AG	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость розового цвета или бесцветная	0,3 мл 1 пробирка
Отрицательный контрольный образец инактивированный К ⁻ AG	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета или бесцветная	0,3 мл 1 пробирка
Конъюгат	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета	от 0,25 до 1,5 мл 1 пробирка
Концентрат раствора № 1 для промывания планшетов (ˆ25)	Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно расслоение и выпадение	25 мл 2 флакона

	кристаллического осадка, растворяющегося при температуре от +35 °С до +37 °С в течение 30 минут	
Раствор № 2 для разведения образцов	Прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании	26 мл 2 флакона
Раствор № 3 для разведения конъюгата	Прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	26 мл 1 флакон
Раствор № 4 для разведения хромогена	Прозрачная бесцветная жидкость	25 мл 1 флакон или 13 мл 2 флакона
Хромоген	Прозрачная бесцветная жидкость	2,5 мл 1 пробирка
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость	15 мл 1 флакон
Ванночка для разведения реагентов	Ванночка из поливинилхлорида для 8-ми канального дозатора	2 шт.
Пленка для заклеивания планшета	Самоклеющаяся влагонепроницаемая пленка	2 шт.

Один набор рассчитан на проведение 96 анализов полевых материалов (клевщи), включая контрольные.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Чувствительность набора по образцам стандартной панели предприятия, содержащим антигены вируса КЭ, составляет 100 %.

Специфичность набора по образцам стандартной панели предприятия, не содержащим антигены вируса КЭ, составляет 100 %.

Специфический антигенный компонент набора реагентов полностью инактивирован и не содержит инфекционного вируса, однако при обследовании полевых или клинических материалов необходимо соблюдать меры предосторожности и обращаться с образцами, сточными растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, как с потенциально инфекционными в соответствии Санитарными правилами (СП 1.3.1287-03) «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности»:

- работать в резиновых перчатках, за защитным экраном;
- не пипетировать растворы ртом, при работе использовать индивидуальные средства защиты (резиновые перчатки и защитные очки);

- все отработанные растворы и отходы после завершения анализа обрабатывать в соответствии с установленными нормами безопасности (например, в течение 16-18 часов в растворе гипохлорита натрия в конечной концентрации 1 %);

- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергать автоклавированию в течение 60 мин при +121 °С или сжигать;

- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-м раствором этилового спирта;

- утилизировать отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- дистиллированная или деионизированная вода;

- дезинфицирующие растворы, соответствующие санитарным требованиям;

- резиновые перчатки;

- спирт этиловый;

- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 мл до 5,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- пипетки 8- или 12-канальные автоматические со сменными наконечниками позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 мкл до 100 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- центрифуга настольная на (3-10) тыс. об/мин для получения и осветления образцов;

- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью (1,5-2,2) мл для получения, хранения, осветления образцов;

- мерный стакан или цилиндр вместимостью (250-500) мл;

- мерная посуда вместимостью до 25 мл;

- воздушный термостат на +37 °С;

- аппарат для промывания планшетов;

- спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм);

- контейнер для сброса твердых отходов;

- контейнер для слива использованных жидкостей;

- автоклав для инактивации отходов;

- вата гигроскопическая;

- фильтровальная бумага.

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

5.1. Подготовка исследуемых образцов

5.1.1. Приготовление суспензии клещей

Клещей растереть пестиком в фарфоровой ступке. Суспензию готовить, добавляя к гомогенатам физиологический раствор из расчета 0,2 мл на одного клеща, но не более 0,5 мл на пробу (пулы клещей – от 5 до 20 особей). Полученную суспензию развести равным объемом раствора № 2. Для исследования в ИФА использовать надосадочную жидкость после отстаивания суспензии в течение 2-5 часов при температуре 4 °С или центрифугирования образца при 5000 мин в течение 5 мин.

5.1.2. Приготовление суспензий из органов животных и людей

Кусочки органов животных и людей растереть в фарфоровой ступке. К гомогенату добавить физиологический раствор из расчета 0,2 мл на 1 г биологического материала. Полученную суспензию развести равным объемом раствора № 2. В ИФА использовать надосадочную жидкость (после отстаивания суспензии в течение 2-5 часов при температуре +4 °С).

Пробы, подготовленные для анализа, в случае необходимости, можно хранить при температуре не выше -20 °С.

Каждый исследуемый образец или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

ВНИМАНИЕ!

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

При инкубациях не располагать планшеты стопкой!

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

6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

(для проведения 16 анализов, включая контрольные)

Условия и сроки хранения компонентов набора после вскрытия индивидуальной упаковки приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	от +2 °С до +8 °С в плотно закрытом пакете	8 недель
K ⁺ AG, K ⁻ AG, конъюгат, концентрат раствора № 1, растворы № 2, № 3, № 4, хромоген	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 необходимо выдержать при комнатной температуре 30 минут.

Растворы № 2, № 3, стоп-реагент поставляются в готовом виде. Перед использованием флаконы с растворами № 1, № 2, № 3 интенсивно встряхнуть.

6.1. Приготовление рабочего раствора № 1 для промывания планшетов

Содержимое флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхнуть. При выпадении в концентрате кристаллов, его следует прогреть при температуре от +35 °С до +37 °С до полного растворения. 6 мл концентрата раствора № 1 перенести в мерную емкость, довести объем до метки 150 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать.

Готовый раствор хранить не более 24 ч при температуре от +4 °С до +12 °С или 4 часа при температуре от +18 °С до +24 °С.

6.2. Приготовление рабочего разведения конъюгата

Из пробирки с конъюгатом отобрать 40 мкл в чистую емкость и добавить 4 мл раствора № 3. Тщательно перемешать.

Готовый раствор рабочего разведения конъюгата хранить не более 15 мин при температуре от +9 °С до +25 °С в защищенном от света месте.

6.3. Приготовление индикаторного раствора

Отобрать 4,0 мл раствора № 4, поместить в чистую емкость и добавить 0,4 мл хромогена. Тщательно перемешать.

Готовый раствор хранению не подлежит.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором хромогена, буферной смесью с гидроперитом и индикаторным раствором, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе пероксидазной реакции. Избегать также контакта раствора хромогена с металлом.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Освободить планшет из упаковки и оставить в рамке необходимое количество стрипов. Остальные стрипы поместить обратно в пакет и хранить в соответствии с условиями, указанными в Таблице 1.

7.1. Внесение контрольных и испытуемых образцов

Для каждого исследуемого образца использовать две параллельные лунки, обозначаемые в дальнейшем как С-лунка и К-лунка (см. Таблицу 2).

В две С-лунки и в две К-лунки внести по 90 мкл раствора № 2 и по 10 мкл каждого контрольного образца (K^+AG и K^-AG).

Таблица 2. Рекомендуемая схема внесения контрольных и испытываемых образцов

	1	2	3	4
A	K ⁻ AG	K ⁻ AG	№ 5	№ 5
B	K ⁻ AG	K ⁻ AG	№ 6	№ 6
C	K ⁺ AG	K ⁺ AG	№ 7	№ 7
D	K ⁺ AG	K ⁺ AG	№ 8	№ 8
E	№ 1	№ 1	№ 9	№ 9
F	№ 2	№ 2	№ 10	№ 10
G	№ 3	№ 3	№ 11	№ 11
H	№ 4	№ 4	№ 12	№ 12
	С-лунки	К-лунки	С-лунки	К-лунки

В свободные лунки внести приготовленные исследуемые образцы.

Планшет заклеить листом пленки и выдержать в течение 60 мин при температуре $(+37 \pm 1)$ °С.

7.2. Промывание

Удалить жидкость из лунок с помощью аппарата для промывания планшетов. Промыть планшет **трехкратно** рабочим раствором № 1 (см. п. 6.1.), внося в лунки по 250 мкл раствора и выдерживая раствор в лунках не менее 20 с.

7.3. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (п. 6.2.). Планшет заклеить новым листом пленки и выдержать в течение 60 мин при температуре $(+37 \pm 1)$ °С.

7.4. Промывание

Удалить жидкость из лунок с помощью аппарата для промывания планшетов. Промыть планшет **шестикратно** рабочим раствором № 1 (см. п. 6.1.), внося в лунки по 250 мкл раствора и выдерживая раствор в лунках не менее 20 с.

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

7.5. В каждую лунку планшета внести по 100 мкл индикаторного раствора (п. 6.3.). Планшет поместить в защищенное от света место на 15 мин при температуре от +15 °С до +25 °С.

7.6. Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и немедленно провести 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») возможно осуществлять по воздуху.

8.1. Результаты измерения, полученные на контрольных образцах должны удовлетворять следующим требованиям:

среднее значение ОП в С-лунках с положительным контролем	не менее 0,80
среднее значение ОП в К-лунках с положительным контролем	не более 0,20
среднее значение ОП в С-лунках с отрицательным контролем	не более 0,20
среднее значение ОП в К-лунках с отрицательным контролем	не более 0,20

При получении иных показателей исследование повторить.

8.2. Рассчитать среднее арифметическое значение $ОП_{срК^+AG}$ для $К^+AG$ по двум С-лункам.

Исследуемый образец считается положительным, если:

1. ОП в С-лунке $\geq 0,35$ о.е.
2. ОП в С-лунке $> 3 \times ОП_{срК^+AG}$
3. ОП в С-лунке $> 3 \times ОП$ в К-лунке
4. ОП в К-лунке $\leq 0,3$ о.е.

Если ОП для исследуемого образца в К-лунке превышает 0,3 о.е., то такой результат не учитывается.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор транспортируют и хранят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от +2 °С до +8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование в течение 3 суток при температуре от +9 °С до +25 °С.

Условия отпуска: для диагностики *in vitro* в лечебно-профилактических и санитарно-противоэпидемиологических учреждениях.

Рекламации на качество набора направлять в ЗАО БТК «Биосервис» по адресу: 115088, г. Москва, а/я 20, тел./факс (495) 674-5605.

10. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.