

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления IgG-антител к
вирусу клещевого энцефалита

«БиоСкрин-КЭ»

(комплект G авто)

Е-1145А БиоСкрин-КЭ
комплект G авто

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «БиоСкрин-КЭ» (комплект G авто) предназначен для выявления IgG-антител к вирусу клещевого энцефалита в сыворотке/плазме крови человека методом иммуноферментного анализа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

На поверхности лунок планшета для иммунологических реакций адсорбирован антиген вируса клещевого энцефалита.

Положительный контрольный образец, инактивированный K⁺ представляет собой сыворотку крови человека, содержащую IgG-антитела к вирусу клещевого энцефалита, не содержащую антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1, HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Отрицательный контрольный образец, инактивированный K⁻ представляет собой сыворотку крови человека, не содержащую IgG-антител к вирусу клещевого энцефалита, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1, HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Конъюгат представляет собой моноклональные антитела мыши к Fc-фрагменту IgG человека, связанные с ферментом пероксидазой хрена.

Раствор № 4 для разведения хромогена содержит субстрат ферментативной реакции.

Хромогеном является 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

При внесении в лунки планшета исследуемых образцов сывороток антитела, специфичные к белкам вируса клещевого энцефалита, взаимодействуют с адсорбированным антигеном, образуя иммунные комплексы. После отмывки не связавшихся антител в лунки добавляют конъюгат - антитела (мышинные моноклональные) к Fc-фрагменту IgG человека, меченные пероксидазой хрена, - который взаимодействует с комплексом антиген-антитело. После отмывки несвязавшейся части конъюгата в лунки планшета добавляют раствор гидроперита и хромоген. После остановки реакции стоп-реагентом интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют по оптическому поглощению при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм) на спектрофотометре. Его величина зависит от концентрации IgG антител к вирусу клещевого энцефалита в образце сыворотки или плазмы крови человека.

Для проведения анализа используются образцы (сыворотка или плазма крови человека) в объеме не менее 5 мкл.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Набор выпускается в виде реагентов, упакованных в коробку:

Реагент	Описание	Количество
Иммуносорбент	Разборный 96-луночный планшет с прозрачным плоским дном лунок.	1 шт.
Положительный контрольный образец инактивированный К ⁺ G	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.	1,5 мл 2 пробирки
Отрицательный контрольный образец инактивированный К ⁻ G	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета.	1,5 мл 2 пробирки
Конъюгат	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.	12 мл 1 флакон
Концентрат раствора № 1 для промывания планшетов (×25)	Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре (35-37) °С в течение 30 мин.	30 мл 1 флакон
Раствор № 2 для разведения сывороток	Прозрачная или опалесцирующая пенящаяся жидкость синего цвета, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	25 мл 1 флакон
Раствор № 4 для разведения хромогена	Прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл 1 флакон
Хромоген	Прозрачная бесцветная жидкость.	1,5 мл 1 пробирка
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость.	8 мл 1 флакон
Планшет для предварительного разведения образцов	Разборный полистироловый или полихлорвиниловый 96-луночный планшет с прозрачными бесцветными лунками с плоским дном.	1 шт.
Ванночка для разведения реагентов	Ванночка из поливинилхлорида для 8-ми канального дозатора.	2 шт.
Пленка для заклеивания планшета	Самоклеющаяся влагонепроницаемая пленка.	2 шт.

Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Со всеми тестируемыми образцами, отработанными растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, обращайтесь как с потенциально инфицированными объектами:

- не пипетируйте растворы ртом, при работе используйте 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 сбрасывайте в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергайте автоклавированию в течение 60 мин при 121°C или сжигайте;
- инструменты и оборудование до и после работы протирайте 70 %-м спиртом;
- утилизируйте отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.

Для проведения анализа необходимо использовать:

- дистиллированную или деионизованную воду;
- хлорамин или перекись водорода для обеззараживания;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;
- пипетки одноканальные автоматические для подачи жидкостей вместимостью от 5 мкл до 1000 мкл;
- пипетки 8- или 12-канальные для подачи жидкости вместимостью от 50 мкл до 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые вместимостью 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые вместимостью 1000 мкл;
- центрифугу настольную на $(3-10) \times 10^3$ об/мин;
- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью (1,5-2,2) мл для хранения и осветления и для предварительного разведения образцов сыворотки;
- мерные стаканы или цилиндры вместимостью 250 мл и 500 мл;
- ванночки для реагентов или стеклянные чашки Петри;
- воздушный термостат на 37 °С;
- спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- контейнер для сброса твердых отходов;
- автоклав для инактивации отходов;
- контейнер для слива отработанных жидкостей;
- вату гигроскопическую;
- фильтровальную бумагу;
- пленку полиэтиленовую;

Рекомендуется использование аппарата для промывания планшетов и встряхивателя для перемешивания.

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исключения ложных результатов готовьте и храните исследуемые образцы в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, осветляйте центрифугированием. Собранные образцы сывороток или плазмы храните при температуре от 4°С до 6°С. Если образцы невозможно протестировать в течение 72 ч, то храните их при температуре не выше минус 15°С. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Помните, что исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, может привести к получению ложных результатов.

В предлагаемой тест-системе могут быть исследованы образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

5.1. Подготовка испытуемых образцов сывороток.

Испытуемые сыворотки разведите в 10 раз раствором для разведения сывороток в планшете для предварительного разведения, перемешайте пипетированием или с помощью встряхивателя.

Разведенные испытуемые образцы сывороток не храните!

Каждый образец сыворотки необходимо отбирать новым наконечником.

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

Анализ проб следует проводить так, чтобы на одного оператора одновременно приходилось не более одного набора.

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ (для проведения 8 анализов)

Условия и сроки хранения вскрытых компонентов набора приведены в Таблице 1.

Таблица 1.

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	от 2 до 8°С в плотно закрытом пакете	8 недель
K ⁺ , K ⁻ , конъюгат, концентрат раствора № 1, раствор для предварительного разведения сывороток, растворы № 2, № 4, хромоген	от 2 до 8°С	8 недель
Стоп-реагент	от 2 до 8°С	до окончания срока годности набора

Перед началом работы набор выдержите при комнатной температуре 30 минут.

Раствор № 2, конъюгат, стоп-реагент, K^+ и K^- готовы к применению.

В растворе № 2, возможно выпадение рыхлого комкующегося осадка, перед использованием его обязательно интенсивно встряхните до исчезновения осадка.

K^+ и K^- перед использованием обязательно перемешайте.

6.1.1. Приготовление рабочего раствора № 1 для промывания планшетов.

Содержимое флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхните. При выпадении в концентрате кристаллов прогрейте его перед разведением при температуре $35^{\circ}C - 37^{\circ}C$ до полного растворения. 4 мл концентрата раствора № 1 перенесите в мерную емкость, доведите объем до метки 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешайте.

Готовый раствор храните не более 24 ч при температуре от $4^{\circ}C$ до $12^{\circ}C$ или 4 часа при температуре от $18^{\circ}C$ до $24^{\circ}C$.

6.1.2. Приготовление индикаторного раствора.

За 5-10 мин до окончания реакции с конъюгатом приготовьте рабочее разведение хромогена. Отберите 1 мл раствора № 4, поместите в чистую емкость и добавьте 0,1 мл хромогена в расчете на 1 стрип (8 лунок). Тщательно перемешайте.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с конъюгатом, хромогеном, раствором № 4 и индикаторным раствором, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе пероксидазной реакции. Избегайте также контакта этих реагентов с металлами.

6.2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ

6.2.1. Иммуносорбент освободите от упаковки, оставив в каретке количество стрипов, необходимое для проведения анализа. Остальные стрипы поместите обратно в пакет и храните в соответствии с условиями, указанными в таблице № 1.

6.2.2. Внесение испытуемых и контрольных образцов сывороток.

В две лунки внесите по 100 мкл K^- , в две лунки - по 100 мкл K^+ . В остальные лунки внесите по 90 мкл раствора № 2 и по 10 мкл 10-кратно разведенных исследуемых образцов из планшета для предварительного разведения (см. п. 5.1.).

Планшет заклейте пленкой и выдержите в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^{\circ}C$.

6.2.3. Промывание.

Удалите жидкость из лунок автоматическим или ручным промывателем.

Планшет **пятикратно** промойте раствором № 1 (см. п. 6.1.1.), внося в лунки по 250 мкл промывающего раствора и выдерживая раствор в лунках не менее 20 с. После промывания тщательно удалите остатки влаги из планшета, постукивая планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

Внимание! Недостаточное промывание планшетов может привести к получению ложных результатов!

6.2.4. Во все лунки планшета внесите по 100 мкл конъюгата. Планшет заклейте пленкой и выдержите в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

6.2.5. Повторите процедуру промывания, описанную в п. 6.2.3.

6.2.6. Во все лунки планшета внесите 100 мкл индикаторного раствора (п. 6.1.2.). Планшет поместите в защищенное от света место на (15 ± 2) мин при температуре $(18-25)^\circ\text{C}$.

Не располагайте планшеты стопкой!

Чем выше температура воздуха в помещении во время инкубации с субстратом, тем выше величины ОП.

6.2.7. Остановите пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и немедленно проведите учет результатов.

Достоверность анализа можно увеличить, размещая и измеряя каждую анализируемую дозу в двух параллельных лунках (дубликатах).

7. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение оптической плотности (ОП) проводите при длине волны 450 нм. Рекомендуемая длина волны сравнения (620-650) нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществляйте по воздуху.

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

среднее значение ОП для K^+ не менее 0,80

среднее значение ОП для K^- не более 0.20

При получении иных показателей исследование повторить.

7.2. Исследуемый образец считается положительным, если:

ОП образца $\geq 0,35$

При необходимости возможно определение титра IgG-антител в исследуемых сыворотках. Титром антител является последнее разведение сыворотки, при котором результат анализа является положительным. Оценку результатов диагностических исследований следует проводить на основании сравнения титров парных сывороток от одного пациента, определенных на одном рабочем планшете. Выявленное минимум 4-кратное увеличение титра антител между двумя сыворотками может свидетельствовать о наличии инфекции.

Нельзя исключить наличие перекрестной реактивности с другими флавивирусами, например, у пациентов, положительных по антителам к вирусу Западного Нила и вирусу Денге. Для установления диагноза всегда, кроме результатов серологических исследований, необходимо учитывать клинические симптомы пациента.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор транспортируйте и храните 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 сут. при температуре от 9°С до 30°С.

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

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

9. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора 12 месяцев. Запрещается применение набора и его компонентов после окончания срока годности набора.