

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для подтверждения выявления

антител к вирусу клещевого

энцефалита

«БиоСкрин - КЭ»

(комплект подтверждающий тест)

Е-1185 БиоСкрин-КЭ
комплект подтверждающий тест

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «БиоСкрин-КЭ» (комплект подтверждающий тест) предназначен для подтверждения выявления антител (IgG, IgM и др.) к вирусу клещевого энцефалита в сыворотке/плазме крови человека методом иммуноферментного анализа. В данном наборе рекомендуется исследовать все образцы, для которых был получен положительный результат в наборах реагентов «БиоСкрин-КЭ» (IgG) - # E-1145, «БиоСкрин-КЭ» (IgM) - # E-1135, а также в диагностических наборах других производителей, предназначенных для выявления антител к вирусу клещевого энцефалита.

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 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 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 белку Е вируса клещевого энцефалита, связанные с пероксидазой хрена.

Субстратная смесь содержит субстрат ферментативной реакции и хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

Стоп-реагент представляет собой 0,5 М раствор серной кислоты.

При конкурентном методе иммуноферментного анализа в лунки планшета с адсорбированным антигеном одновременно вносятся исследуемые сыворотки и конъюгат - моноклональные антитела мыши к белку Е вируса клещевого энцефалита, связанные с пероксидазой хрена.

При последующей инкубации антитела, содержащиеся в сыворотке, и конъюгат конкурируют за связывание с иммобилизованными на твердом носителе антигеном. Количество конъюгата, присоединившегося к твердой фазе, обратно пропорционально содержанию специфических антител в исследуемой сыворотке. После отмывки несвязавшихся компонентов в лунки планшета добавляют субстратную смесь. 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. Интенсивность окрашивания в лунках с анализируемыми образцами сравнивается с интенсивностью окрашивания в лунке с отрицательным контрольным образцом. При наличии специфических антител в сыворотке интенсивность окрашивания меньше.

Для проведения анализа используются образцы (сыворотка или плазма крови человека) в объеме не менее 50 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 K ⁺	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.	1 мл 1 пробирка
Отрицательный контрольный образец, инактивированный K ⁻	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	1 мл 1 пробирка
Конъюгат	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость темно-красного цвета.	6 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
Субстратная смесь	Прозрачная жидкость розового цвета. Возможно выпадение осадка, растворяющегося при температуре 18-25 °С в течение 30 мин.	12 мл 1 флакон
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость.	6 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.

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° С 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;
- аппарат для промывания планшетов;
- 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;
- контейнер для сброса твердых отходов;
- автоклав для инактивации отходов;
- контейнер для слива отработанных жидкостей;
- вату гигроскопическую;
- фильтровальную бумагу;
- пленку полиэтиленовую.

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 не могут быть исследованы образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

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

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

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	2 месяца
K ⁺ , K ⁻ , конъюгат, концентрат раствора № 1, субстратная смесь	от 2 до 8° С	2 месяца
Стоп-реагент	от 2 до 8° С	до окончания срока годности набора

Перед началом работы набор выдержите при комнатной температуре 30 минут.

Конъюгат, субстратная смесь, стоп-реагент, K⁺ и K⁻ готовы к применению.

K⁺ и K⁻ перед использованием обязательно перемешайте.

6.1.1. Приготовление рабочего раствора № 1 для промывания планшетов.

Приготовить разведением в 25 раз. Содержимое флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхните. При выпадении в концентрате кристаллов прогрейте его перед разведением при температуре 35 °С - 37 °С до полного растворения. 1 часть концентрата раствора № 1 перенесите в мерную емкость, растворите 24 частями дистиллированной или деионизованной воды и тщательно перемешайте (например, к 2 мл концентрата следует добавить 48 мл воды).

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

ВНИМАНИЕ! Посуду, контактирующие с конъюгатом и субстратной смесью, 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 50 мкл K^- , в две лунки - по 50 мкл K^+ . В остальные лунки внесите по 50 мкл исследуемых образцов.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K^-	5	13									
B	K^-	6	14									
C	K^+	7	15									
D	K^+	8										
E	1	9										
F	2	10										
G	3	11										
H	4	12										

Во все лунки планшета внесите по 50 мкл конъюгата, тщательно перемешайте инкубационную смесь. Планшет заклейте пленкой и выдержите в течение 60 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ C$.

Достоверность результата можно увеличить, размещая каждую пробу в дублях.

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 100 мкл субстратной смеси. Планшет поместите в защищенное от света место на (15 ± 2) мин при температуре $(18-25)^\circ C$.

6.2.5. Остановите пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-реагента, слегка покачайте планшет, чтобы раствор гомогенно распределился. Проведите учет результатов.

Процедура анализа может быть полностью или частично автоматизирована и выполнена ИФА анализатором.

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 К- должно быть не менее 0,8;
- среднее значение ОП К+ должно быть не более 0,3;
- коэффициент позитивности P_i , вычисляется по формуле:

$$P_i = 100 - [\text{ОП образца} / \text{ОП К-}] \times 100\%.$$

Образец считается положительным (содержащим антитела к вирусу клещевого энцефалита), если $P_i \geq 50\%$. Если для исследуемого образца $P_i < 50\%$, то образец либо не содержит антител к вирусу клещевого энцефалита, либо содержит их в концентрации ниже уровня чувствительности набора реагентов.

Так как в наборах, предназначенных для выявления антител к флавивирусам перекрестная активность не исключается, и вирус КЭ имеет перекрестную реактивность, как правило, с вирусом Западного Нила и вирусом Денге, то набор БиоСкрин-КЭ (подтверждающий тест) рекомендуется использовать также для исключения ложноположительных результатов в наборах реагентов "БиоСкрин-ВЗН (IgG)" # Е-1345 и "БиоСкрин-Денге (IgG)" # Е-1545.

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 суток 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.

ДЛЯ ЗАМЕТОК