

ИНСТРУКЦИЯ

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

«БиоСкрин-КЭ»

(комплект М)

ФСР

Е-1135
БиоСкрин-КЭ
комплект М

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект «М» набора реагентов «БиоСкрин-КЭ» предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу клещевого энцефалита (КЭ) в сыворотке/плазме крови человека методом иммуноферментного анализа при проведении диагностических исследований.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

На поверхности лунок полистиролового планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела против иммуноглобулинов человека класса М.

Каждый образец исследуется в двух параллельных лунках, обозначаемых в дальнейшем как С-лунка и К-лунка. При инкубации образцов сывороточные антитела IgM связываются с антителами, иммобилизованными в лунках планшета. На следующей стадии в лунки добавляют специфический антиген вируса КЭ (С-лунка) и контрольный антиген (К-лунка). Если в исследуемом образце присутствуют IgM-антитела к вирусу КЭ, то в процессе инкубации вирусный антиген специфически связывается с сывороточными антителами класса М, в лунке с контрольным антигеном связывания не происходит. После отмывки 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 IgM-антител к вирусу 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 ⁺ М	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость розового цвета.	0,3 мл 1 пробирка
Отрицательный контрольный образец инактивированный К ⁻ М	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета	0,3 мл 1 пробирка
Специфический антиген	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	0,2 мл 1 пробирка
Контрольный антиген	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	0,2 мл 1 пробирка

E-1135 **БиоСкрин-КЭ**
комплект М

Конъюгат	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	от 0,25 до 1,5мл 1 пробирка
Концентрат раствора № 1 для промывания планшетов (ˆ25)	Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре от +35 °С до +37 °С в течение 30 минут.	25 мл 2 флакона
Раствор для предварительного разведения сывороток	Пенящаяся прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета, возможно выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании	15 мл 1 флакон
Раствор № 2 для разведения сывороток и антигена	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.	15мл 1 флакон
Планшет для предварительного разведения образцов	Цельный или разборный полистироловый 96-луночный планшет с прозрачными бесцветными лунками с плоским дном.	1 шт.
Ванночка для разведения реагентов	Ванночка из пластика для 8-ми канального дозатора.	2 шт.
Пленка для заклеивания планшета	Самоклеющаяся влагонепроницаемая пленка.	2 шт.

Один набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные.

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

Чувствительность набора по сывороткам стандартной панели предприятия, содержащим IgM-антитела к вирусу КЭ, составляет 100 %.

Специфичность набора по сывороткам стандартной панели предприятия, не содержащим IgM-антитела к вирусу 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

Для проведения анализа используются образцы сыворотки крови человека в объеме 20 мкл.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Следует осветлять образцы, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием (10±1) мин при (2500-3000) об/мин. Допускается хранение собранных образцов сыворотки при температуре от +4 °С до +6 °С в течение 7 суток. Для более длительного хранения образцы следует замораживать. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

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

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
Специфический и контрольный антигены	от +2 °С до +8 °С	8 недель
K ⁺ M, K ⁻ M, конъюгат, концентрат раствора № 1, раствор для предварительного разведения сывороток, 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.

Раствор для предварительного разведения сывороток, 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. Подготовка испытуемых образцов

6.2.1. Для первичного скрининга

Испытуемые сыворотки развести в 10 раз, внося в лунки планшета для предварительного разведения сывороток по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток и по 10 мкл исследуемых образцов, перемешать пипетированием или с помощью встряхивателя. При внесении сывороток цвет раствора для предварительного разведения изменяется с синего на голубой.

6.2.2. Для лабораторного подтверждения диагноза клещевого энцефалита.

Каждый образец сыворотки, выявленный при скрининге как положительный, необходимо исследовать повторно для подтверждения положительного результата анализа и при необходимости определения титра IgM-антител. Титром антител является последнее разведение сыворотки, при котором результат анализа является положительным. Образец титровать непосредственно в рабочем планшете на этапе внесения в него сывороток.

Разведенные испытуемые образцы не хранить!

6.3. Приготовление раствора специфического антигена

К 20 мкл специфического антигена добавить 2 мл раствора № 2.

6.4. Приготовление раствора контрольного антигена

К 20 мкл контрольного антигена добавить 2 мл раствора № 2.

Разведенные специфический и контрольный антигены не хранить!

6.5. Приготовление рабочего разведения конъюгата

Из пробирки с конъюгатом отобрать 40 мкл в чистую емкость и добавить 4 мл раствора № 3 (конечное разведение 1:100). 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.

6.6. 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 планшеты из упаковки и оставить в каретке 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 сывороток

Для каждого исследуемого образца использовать две параллельные лунки, обозначаемые в дальнейшем как С-лунка и К-лунка (например так, как указано в Таблице 2).

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

В свободные лунки внести по 90 мкл раствора № 2 и по 10 мкл 10-кратно разведенных исследуемых образцов из планшета для предварительного разведения. (см. п. 6.2.)

При первичном скрининге исследовать образцы в 100-кратных разведениях.

При подтверждающем исследовании образец необходимо титровать, внося каждое его разведение в С- и К-лунки параллельных рядов (п. 6.2.2.).

Таблица 2. Рекомендуемая схема внесения контрольных и испытуемых образцов.

	1	2	3	4
A	K ⁻ M	K ⁻ M	№ 5	№ 5
B	K ⁻ M	K ⁻ M	№ 6	№ 6
C	K ⁺ M	K ⁺ M	№ 7	№ 7
D	K ⁺ M	K ⁺ M	№ 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

Планшет заклеить листом пленки и выдержать в течение 60 мин при температуре (+37±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 в лунках не менее 20 с.

7.3 Внесение специфического и контрольного антигенов

Во все С-лунки планшета внести по 100 мкл специфического антигена в рабочем разведении (п. 6.3.).

Во все К-лунки планшета внести по 100 мкл контрольного антигена в рабочем разведении (п. 6.4.).

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

7.4. Промывание. Повторите процедуры, описанные в п. 7.2

7.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (п. 6.5.). Планшет заклеить новым листом пленки и выдержать в течение 60 мин при температуре (+37±1) °С.

7.6. 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 в лунках не менее 20 с.

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

7.7. В каждую лунку планшета внести по 100 мкл индикаторного раствора (п. 6.6.). Планшет поместить в защищенное от света место на 15 мин при температуре от +15 °С до +25 °С.

7.8. 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 $ОП_{СРКМ}$ для КМ по двум С-лункам

Исследуемый образец считается положительным при выполнении следующих условий:

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

Исследуемый образец рассматривается как неопределенный, если:

1. ОП в С-лунке от 0,25 о.е. до 0,34 о.е.
2. ОП в К-лунке $< 0,1$ о.е.

В случае неопределенного результата рекомендуется исследовать образец, повторно взятый у того же пациента. Оценку результатов следует проводить на основании сравнения исследования парных сывороток от одного пациента на одном рабочем планшете. При повторном получении сомнительного результата при исследовании парных сывороток рекомендуется тестировать эти образцы другими методами.

Результат анализа рассматривается как ложноположительный, если ОП в К-лунке превышает 0,3 о.е. В этом случае образец необходимо исследовать повторно.

8.3. Для образцов, выявленных при первичном скрининге как положительные, рекомендуется с целью подтверждения положительного результата анализа определить титр IgM-антител к вирусу.

Важно помнить, что IgM-антитела к вирусу КЭ появляются, как правило, на 3-4 день болезни и являются маркерами острой инфекции.

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.

ДЛЯ ЗАМЕТОК