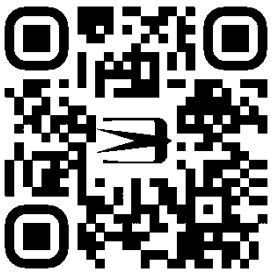
И Н С Т Р У К Ц И Я

по применению набора реагентов для выявления антител класса IgM к вирусу Денге в сыворотке/плазме крови человека методом иммуноферментного анализа

«БиоСкрин-Денге-IgM»

Е-1535 БиоСкрин-Денге-IgM



www.bioservice.ru

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «БиоСкрин-Денге-IgM» предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу Денге в сыворотке/плазме крови человека методом иммуноферментного анализа при проведении сероэпидемиологических и диагностических исследований.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

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

ВНИМАНИЕ: каждый образец тестируется в двух параллельных С- и К-лунках. При инкубации образцов сывороточные IgM-антитела связываются с антителами, иммобилизованными в лунках планшета. На следующей стадии в лунки добавляют специфический антиген Денге (С-лунка) и контрольный антиген (К-лунка). Если в исследуемом образце присутствуют IgM-антитела к Денге, то в процессе инкубации вирусный антиген специфически связывается с сывороточными IgM-антителами, в лунке с контрольным антигеном связывания не происходит. На следующей стадии вносят конъюгат, представляющий собой специфические антитела к Денге, меченные пероксидазой хрена. После удаления (отмывки) не связавшихся молекул конъюгата в лунки планшета добавляют рабочий раствор ТМБ, включающий субстрат и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Пероксидаза катализирует реакцию окисления хромогена (ТМБ) в присутствии перекиси водорода, что приводит к образованию окрашенного продукта. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию специфических IgM-антител 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 (ИС)	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 красного 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 (спАГ)	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	0,2 мл 1 пробирка
Контрольный антиген (кАГ)	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	0,2 мл 1 пробирка

Концентрат конъюгата (КК)	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	0,3 мл 1 пробирка
Концентрат раствора для промывания планшетов (ПР× 25)	Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость. При хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре от +35 ºС до +37 ºС в течение 30 минут.	25 мл 2 флакона
Раствор для предварительного разведения образцов (РПРО)	Прозрачная жидкость жёлтого цвета.	13 мл 1 флакон
Раствор для разведения образцов и антигенов (РРОА)	Прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость. При хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	25 мл 2 флакона
Раствор для разведения конъюгата (РРК)	Прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость. При хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	25 мл 1 флакон
Раствор для разведения хромогена (РРХ)	Прозрачная бесцветная жидкость.	13 мл 2 флакона
Хромоген (ТМБ)	Прозрачная бесцветная жидкость.	2,5 мл 1 пробирка
Стоп-реагент (СР)	Прозрачная бесцветная жидкость.	13 мл 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	Самоклеящаяся влагонепроницаемая пленка.	2 шт.

Один набор рассчитан на проведение 96 определений, включая контрольные образцы.

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

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

Специфичность набора по сывороткам стандартной панели предприятия, не содержащим IgM-антитела к Денге, составляет 100 %.

Специфический антигенный компонент набора реагентов полностью инактивирован и не содержит инфекционного вируса, однако при обследовании

клинических образцов 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 СП 3.3686-21 (IV) «Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА»:

- 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 +121ºС 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 70%;
- 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 %);
- наконечники полипропиленовые вместимостью до 200 мкл, до 1000 мкл, до 5000 мкл;
- 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 +37ºС;
- 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;

- холодильник с камерами, поддерживающими температурные режимы +4ºС и -20ºС;
- автоклав для инактивации отходов;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага.

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для проведения анализа используются образцы сыворотки или плазмы крови человека в объеме не менее 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. Собранные образцы хранить при температуре от +4ºС до +6ºС. Если образцы невозможно протестировать в течение 7 суток, то их следует хранить при температуре не выше –20ºС. 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 необходимо отбирать новым наконечником.

5.1. Для проведения сероэпидемиологических исследований.

Содержимое флакона РПРО интенсивно встряхнуть. Испытуемые сыворотки развести в планшете для предварительного разведения РПРО в 10 раз (90 мкл РПРО + 10 мкл испытуемой сыворотки), перемешать пипетированием или с помощью встряхивателя. При внесении сывороток цвет раствора для предварительного разведения изменяется с жёлтого на розовый.

5.2. Для проведения диагностических исследований.

Для лабораторного подтверждения диагноза Денге рекомендуется исследовать парные сыворотки, полученные с интервалом от 7 до 14 суток. Каждый образец сыворотки следует титровать с двукратным шагом, начиная от 1:100.

Разведенные сыворотки хранению не подлежат!

ВНИМАНИЕ!

Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, кроме неспецифических компонентов (ПРх25, РПРО, РРОА, РРК, ТМБ, РРХ, СР), которые взаимозаменяемы во всех наборах «БиоСкрин» для арбовирусных инфекций АО БТК «Биосервис».

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

Перед началом работы необходимо выдержать при комнатной температуре **в течение 30 мин** набор и все компоненты, которые будут использованы в анализе.

Условия и сроки хранения компонентов набора приведены в Таблице №1.

Таблица №1

Условия и сроки хранения компонентов набора

Условия транспортировки набора регентов		
При температуре от +2ºС до +8ºС	Согласно СП 3.3683-21 (XLVIII)	
При температуре от +9ºС до +25ºС	В течение 3 суток	
Замораживание не допускается!		
Условия хранения набора реагентов		
При температуре от +2ºС до +8ºС	Согласно СП 3.3683-21 (XLVIII), в сухом, защищённом от света месте в холодильных камерах или в холодильниках	В течение установленного срока годности, указанного на наборе
Замораживание не допускается!		
Срок годности набора – 12 месяцев		
Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит		
Условия и сроки хранения неиспользованных компонентов набора после вскрытия индивидуальной упаковки		
Компонент	**Условия хранения**	**Сроки хранения**
ИС	Неиспользованные стрипы поместить в оригинальную упаковку, дополнительно можно вложить осушитель-силикагель. В таком виде хранить при температуре от +2ºС до +8ºС в холодильных камерах или в холодильниках	В течение 2 месяцев
$К^+М$ ПРх25 $К^-М$ РРОА спАГ РРК кАГ РРХ КК ТМБ	При температуре от +2ºС до +8ºС в холодильных камерах или в холодильниках	В течение 2 месяцев
СР		В течение установленного срока годности, указанного на этикетке компонента
Условия и сроки хранения готовых рабочих растворов		
Рабочий раствор ПРх25	При температуре от +18ºС до +25ºС	Не более 4 ч
	При температуре от +4ºС до +12ºС	Не более 24 ч
Рабочее разведение конъюгата	При температуре от +9ºС до +25ºС в защищённом от света месте	Не более 15 мин
Рабочие растворы: спАГ, кАГ, ТМБ		Хранению не подлежит

ВНИМАНИЕ! Перед использованием флаконы с $К^+М$, спАГ, кАГ, КК, ПРх25, РПРО, РРОА, РРК - интенсивно встряхнуть.

Растворы РПРО, РРОА, РРК, СР поставляются в готовом виде.

Расчет необходимых объемов реагентов в зависимости от количества используемых стрипов указан в таблице №2.

Таблица №2

	Число используемых стрипов в постановке					
	2	**4**	**6**	**8**	**10**	**12**
Рабочий раствор ПР						
Концентрат ПРх25, мл	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0	24,0
Дистиллированная вода, мл	до 100	до 200	до 300	до 400	до 500	до 600
Рабочий раствор спАг						
спАг, мкл	10	20	30	40	50	60
РРОА, мл	до 1,0	до 2,0	до 3,0	до 4,0	до 5,0	до 6,0
Рабочий раствор кАг						
кАг, мкл	10	20	30	40	50	60
РРОА, мл	до 1,0	до 2,0	до 3,0	до 4,0	до 5,0	до 6,0
Рабочий раствор конъюгата						
КК, мкл	20	40	60	80	100	120
РРК, мл	до 2,0	до 4,0	до 6,0	до 8,0	до 10,0	до 12,0
Рабочий раствор ТМБ						
ТМБ, мкл	200	400	600	800	1000	1200
РРХ, мл	до 2,0	до 4,0	до 6,0	до 8,0	до 10,0	до 12,0
СР						
СР, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0

6.1. Приготовление рабочего раствора ПР для промывания планшетов.

Содержимое флакона с концентратом раствора ПРх25 интенсивно встряхнуть. При выпадении в концентрате кристаллов, его следует прогреть при температуре от +35 ºС до +37 ºС до полного растворения.

В соответствии с числом используемых стрипов необходимое количество концентрата раствора ПРх25 перенести в мерную емкость, довести дистиллированной водой до указанного объема (табл.№2) и тщательно перемешать. Готовый раствор хранить не более 24 ч при температуре от +4ºС до +12ºС или 4 часа при температуре от +18ºС до +24ºС.

6.2. Приготовление рабочего раствора спАГ.

Содержимое флаконов спАГ и РРОА интенсивно встряхнуть. В соответствии с числом используемых стрипов необходимое количество спАг смешать с РРОА (табл.№2). Тщательно перемешать.

Рабочий раствор спАГ не хранить!

6.3. Приготовление рабочего раствора кАГ.

Содержимое флаконов кАГ и РРОА интенсивно встряхнуть. В соответствии с числом используемых стрипов необходимое количество кАг смешать с РРОА (табл.№2). Тщательно перемешать.

Рабочий раствор кАГ не хранить!

6.4. Приготовление рабочего разведения конъюгата.

Содержимое флакона КК и РРК интенсивно встряхнуть. Отобрать необходимое количество из пробирки КК (табл.№2) и добавить соответствующее количество РРК. Тщательно перемешать.

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

6.5. Приготовление рабочего раствора ТМБ.

Отобрать необходимое количество ТМБ (табл. №2) и добавить соответствующее количество РРХ. Тщательно перемешать. Готовый раствор хранению не подлежит.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с рабочим раствором ТМБ и его компонентами (РРХ и ТМБ), нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку их остаточные количества приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе пероксидазной реакции. Избегать контакта рабочего раствора ТМБ с металлами.

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. **Краткая схема** проведения ИФА представлена в конце инструкции, стр. 12 (используйте эту схему только после полного ознакомления с инструкцией).

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 №3).

Таблица №3

Схема внесения контрольных и испытуемых образцов

	1	2	3	4
A	$К^-М$	$К^-М$	№ 5	№ 5
B	$К^-М$	$К^-М$	№ 6	№ 6
C	$К^+М$	$К^+М$	№ 7	№ 7
D	$К^+М$	$К^+М$	№ 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**

Внести во все лунки планшета по 90 мкл РРОА.

В две С-лунки и в две К-лунки внести по 10 мкл каждого контрольного образца ($К^+М$ и $К^-М$).

В оставшиеся лунки внести по 10 мкл 10-кратно разведенных исследуемых образцов из планшета для предварительного разведения (см. п. 5). **ВНИМАНИЕ: каждый образец тестируется в параллельных С- и К-лунках.**

Инкубация. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре +37 ºС.

При инкубации не располагать планшеты стопкой!

7.2. Промывание.

Удалить жидкость из лунок с помощью аппарата для промывания планшетов. Промыть планшет **3 раза** рабочим раствором ПР (см. п. 6.1.), внося его в лунки по 400 мкл и выдерживая в лунках не менее 20 с.

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

7.3. Внесение рабочих растворов спАГ и кАГ.

Во все С-лунки планшета внести по 100 мкл спАГ в рабочем разведении (см. п. 6.2.).

Во все К-лунки планшета внести по 100 мкл кАГ в рабочем разведении (см. п. 6.3.).

Инкубация. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре +37ºС. **При инкубации не располагать планшеты стопкой!**

7.4. Промывание.

Повторите процедуры, описанные в п. 7.2.

7.5. Внесение рабочего разведения конъюгата.

Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (см. п. 6.4.).

Инкубация. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре (+37±1)ºС.

7.6. Промывание.

Удалить жидкость из лунок с помощью аппарата для промывания планшетов. Промыть планшет **5 раз** рабочим раствором ПР (см. п. 6.1.), внося его в лунки по 400 мкл и выдерживая в лунках не менее 20 с.

7.7. Внесение рабочего раствора ТМБ.

В каждую лунку планшета внести по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (см. п. 6.5.). Планшет поместить в защищенное от света место на 15 мин при температуре от +15ºС до +25ºС.

7.8. Внесение СР.

Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл СР 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 $К^{+}М$	не менее 0,60
среднее значение ОП в К-лунках с $К^{+}М$	не более 0,20
среднее значение ОП в С-лунках с $К^{-}М$	не более 0,20
среднее значение ОП в К-лунках с $К^{-}G$	не более 0,20

ВНИМАНИЕ! При получении иных показателей исследование повторить.

8.2. Рассчитать среднее арифметическое значение **$ОП_{СР}К^{-}М$** для $К^{-}М$ по двум С-лункам

Исследуемый образец считается положительным, если ОП образца соответствует **всем** ниже перечисленным пунктам:

1. ОП образца в С-лунке **≥** 0,35
2. ОП образца в С-лунке > 3× $ОП_{СР}К^{-}М$
3. ОП образца в С-лунке > 3× ОП образца в К-лунке
4. ОП образца в К-лунке ≤ 0,3 о.е.

Если ОП для исследуемого образца в К-лунке превышает 0,3 о.е., то такой результат рассматривается как неопределенный и рекомендуется исследовать образец, повторно взятый у того же пациента через неделю. Оценку результатов следует проводить на основании сравнения исследования сывороток от одного пациента на одном рабочем планшете. При повторном получении сомнительного результата рекомендуется тестировать эти образцы другими методами.

При необходимости возможно определение титра IgM-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. Выявленная сероконверсия может свидетельствовать о наличии первичной инфекции. В таком случае образцы рекомендуется исследовать на содержание IgG-антител.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор транспортируют и хранят в соответствии с СанПиН 3.3683-21 (XLVIII) при температуре от +2ºС до +8ºС. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование в течение 3 суток при температуре от +9ºС до +25ºС.

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

10. СРОК ГОДНОСТИ

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

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, ненадлежащих условий транспортирования и хранения, действия третьих лиц, непреодолимой силы. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не

соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Рекламации на качество набора необходимо направлять в АО БТК «Биосервис» по адресу: 115088, г. Москва, а/я 20, тел.+7(495)142-5605,

E-mail: info@bioservice.ru.

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел. +7(495)142-5605

Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «БиоСкрин-Денге-IgM»

Термостат (продолжительность анализа: 3 ч 30 мин)	
Внести:	шаг 1: по 90 мкл РРОА; шаг 2: по 10 мкл $К^{+}М$ и $К^{-}М$; по 10 мкл 10-кратно разведенных анализируемых образцов.
Инкубировать:	60 мин при +37 °С.
Промыть:	3 раза рабочим раствором ПР по 400 мкл.
Внести:	по 100 мкл рабочего раствора спАГ в С-лунки по 100 мкл рабочего раствора кАГ в К-лунки.
Инкубировать:	60 мин при +37 °С.
Промыть:	3 раза рабочим раствором ПР по 400 мкл.
Внести:	по 100 мкл рабочего разведение конъюгата.
Инкубировать:	60 мин при +37 °С.
Промыть:	5 раз рабочим раствором ПР по 400 мкл.
Внести:	по 100 мкл рабочего раствора ТМБ.
Инкубировать:	15 мин при +15 - +25 °С, в темноте.
Внести:	по 50 мкл СР.
Измерить ОП:	при 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм).