ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для подтверждения выявления антител к вирусу клещевого энцефалита

«БиоСкрин-КЭ-IgG»

(подтверждающий тест)

Е-1185 **БиоСкрин-КЭ**

Подтверждающий тест

www.bioservice.ru

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

На поверхности лунок полистиролового планшета иммобилизован антиген вируса КЭ. При конкурентном формате ИФА в лунки планшета одновременно вносятся положительный и отрицательный контрольные образцы, исследуемые сыворотки и конъюгат мышиных моноклональных антител (МАТ) к антигену вируса КЭ с пероксидазой хрена.

При дальнейшей инкубации антитела, содержащиеся в сыворотке, и МАТ в составе конъюгата конкурируют за связывание с иммобилизованным антигеном. Количество конъюгата, связавшегося с твёрдой фазой, обратно пропорционально содержанию специфических антител в исследуемой сыворотке.

После удаления (отмывки) не связавшихся молекул конъюгата в лунки планшета добавляют рабочий раствор, включающий субстрат и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ). Пероксидаза катализирует реакцию окисления хромогена (ТМБ) в присутствии перекиси водорода, что приводит к образованию окрашенного продукта. Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна содержанию специфических антител в исследуемом образце.

После остановки реакции стоп-реагентом (СР) интенсивность окрашивания раствора измеряют на спектрофотометре по оптическому поглощению при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм). Интенсивность окрашивания в лунках с анализируемыми образцами сравнивают с интенсивностью окрашивания в лунке с отрицательным контрольным образцом.

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.	1 шт.
Положительный контрольный образец инактивированный ($К^+$)	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета. Содержит антитела к вирусу КЭ.	1 мл 1 пробирка

Отрицательный контрольный образец инактивированный ($К^-$)	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета. Не содержит антител к вирусу КЭ.	1 мл 1 пробирка
Раствор Конъюгата (РК)	Опалесцирующая жидкость красного цвета.	6 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 1 флакон
Раствор для разведения хромогена(РРХ)	Прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл 1 флакон
Хромоген (ТМБ)	Прозрачная бесцветная жидкость.	1,5 мл 1 флакон
Стоп-реагент (СР)	Прозрачная бесцветная жидкость.	13 мл 1 флакон
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

Диагностическая чувствительность набора по сывороткам стандартной панели предприятия, содержащим IgG-антитела к КЭ, составляет 100 %.

Диагностическая специфичность набора по сывороткам стандартной панели предприятия, не содержащим IgG-антитела к КЭ, 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 60 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.

ВНИМАНИЕ!

Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, кроме неспецифических компонентов (ПРх25, РРХ, ТМБ и 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 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
$К^+$, $К^-$, РК, ТМБ, ПРх25, РРХ	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
Рабочий раствор ТМБ	При температуре от +9ºС до +25ºС в защищённом от света месте	Не более 15 мин

ВНИМАНИЕ! Перед использованием флаконы с K^+, РК, ПРх25, - интенсивно встряхнуть.

Растворы РК и 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
РК						
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
Рабочий раствор ТМБ						
РРХ, мл	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
ТМБ, мл	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
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. Раствор Конъюгата (РК) готов к использованию.

6.3. 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 ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку их остаточные количества приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе пероксидазной реакции. Избегать контакта 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. 9 (используйте эту схему только после полного ознакомления с инструкцией).

7.1. Внесение контрольных и испытуемых образцов (см. Таблицу №3).

Таблица №3

Пример схемы внесения контрольных и испытуемых образцов

	1	2	3	4
A	K^-	№ 5	№ 13	№ 21
B	K^-	№ 6	№ 14	№ 22
C	K^+	№ 7	№ 15	№ 23
D	K^+	№ 8	№ 16	№ 24
E	№ 1	№ 9	№ 17	№ 25
F	№ 2	№ 10	№ 18	№ 26
G	№ 3	№ 11	№ 19	№ 27
H	№ 4	№ 12	№ 20	№ 28

В две лунки внести по 50 мкл каждого контрольного образца (K^+ и K^-). В свободные лунки внести по 50 мкл анализируемых образцов (см. п. 5).

7.2. Внесение рабочего разведения конъюгата.

Во все лунки планшета внести по 50 мкл раствора конъюгата (РК) (см. п. 6.2.).

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

7.3. Промывание.

Удалить жидкость из лунок с помощью аппарата для промывания планшетов. Промыть планшет **5 раз** рабочим раствором ПР (см. п. 6.1.), внося в лунки по 250 мкл раствора и выдерживая раствор в лунках не менее 20 с.

7.4. Внесение рабочего раствора ТМБ.

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

7.5. 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. Рассчитайте подавление ОП для К+ и исследуемых образцов по формуле:

$$P = 100 - [ОП_{образца}/ОП_{К-}] \times 100\%.$$

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

- среднее значение ОП в лунках с К- должно быть не менее 0,80.

Подавление для К+ должно быть не менее 50%.

Исследуемый образец считается положительным, если Р≥50%.

Если для исследуемого образца Р<50%, то образец либо не содержит антител к вирусу КЭ, 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.

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-КЭ» (подтверждающий тест)

Термостат (продолжительность анализа: 1 ч 30 мин)	
Внести:	шаг 1: по 50 мкл $К^+$ и $К^-$ по 50 мкл анализируемых образцов; шаг 2: по 50 мкл РК.
Инкубировать:	60 мин при +37 °С.
Промыть:	5 раз рабочим раствором ПР по 250 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).