

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ**

**ТЕСТ-СИСТЕМА ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
И ПОДТВЕРЖДЕНИЯ НАЛИЧИЯ АНТИТЕЛ К
ВИРУСУ ГЕПАТИТА С
"ИФА-ВГС"**

Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/09794 от 30.12.10. г.

**Комплект № 3
для подтверждения наличия антител к антигенам вируса гепатита С**

НАЗНАЧЕНИЕ

Подтверждение наличия выявленных при скрининге антител классов G и M к отдельным антигенам ВГС в сыворотке (плазме) крови и препаратах крови человека, методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Базовый вариант комплекта включает:

Иммуносорбент	рекомбинантные антигены ВГС, соответствующие участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS3, NS4, NS5) областями генома ВГС, сорбированные двумя группами – core-антиген и NS (NS ₃ + NS ₄ + NS ₅) в лунках стрипов полистироловых планшетов с плоским дном для ИФА по 6 стрипов, по краю стрипов нанесена маркировка в виде полос: на стрипах с core-Ag – красного цвета, на стрипах с NS-Ag – синего цвета. Стрипы упакованы отдельно в пакеты из пленки полиэтиленовой.	core – 6 стр. NS – 6 стр.
Контрольный положительный образец (K+)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость малинового цвета	1 фл. (0,5 мл)
Контрольный отрицательный образец (K-)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость синего цвета	1 фл. (1,0 мл)
Конъюгат	антитела диагностические против IgG и IgM человека с пероксидазой хрена; прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (1,0 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная, пенящаяся жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	1 фл. (40 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	опалесцирующая жидкость сине-фиолетового или красного цвета, допускается выпадение незначительного осадка	1 фл. (12 мл) или 1 фл. (6,0 мл)
Раствор для разведения конъюгата (РПК)	опалесцирующая жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, допускается выпадение незначительного осадка	1 фл. (13 мл)
Цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБР)	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (13 мл)
Хромоген (ТМБ)	раствор тетраметилбензидина; прозрачная жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком или розового цвета	1 фл. (1,3 мл)
Стоп-реагент	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (12,5 мл)

Примечания. 1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(х25), ЦБР, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование разных серий этих реагентов.

3. Допускается использование ТМБ из разных серий набора.

Набор может быть дополнительно укомплектован:

вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.);

одноразовыми наконечниками для автоматических пипеток (16 шт.);

клейкой пленкой для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплекта рассчитан на исследование 48 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 6 лунок – по 3 лунки на стрип).

Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Кол-во стрипов одной группы/всего	1/2	2/4	3/6	4/8	5/10	6/12
Число исследуемых образцов	1-5	6-13	14-21	22-29	30-37	38-45

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Основой тест-системы являются отдельно иммобилизованные на поверхности лунок антигены ВГС, соответствующие участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS₃, NS₄, NS₅) областями генома ВГС.

Тест-система выявляет антитела к разным антигенам ВГС в сыворотке (плазме) крови человека вследствие их взаимодействия с антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок планшета. Образующиеся комплексы антиген-антитело обнаруживаются с помощью конъюгата – антител против иммуноглобулинов человека, связанных с пероксидазой хрена.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая специфичность и чувствительность 100 % при проверке на сыворотках стандартной панели ОСО 42-28-310-02П.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Образцы до исследования могут храниться при температуре от 2 до 8 °С до 7 сут.; более длительное хранение (до трех месяцев) – при температуре не выше минус 20 °С. Повторное замораживание образцов не допускается.

Образцы, содержащие частицы фибрина или иные видимые глазом примеси, перед исследованием осветлить центрифугированием (10-15 мин при 2500-3000 об/мин).

Для исследования образцов иммуноглобулинов человека исходные растворы развести ФСБ-Т в соотношении 1:10, лиофильно высушенные препараты крови предварительно восстановить согласно инструкции по их применению, затем развести ФСБ-Т в соотношении 1:10.

Для исключения ложноположительных результатов не рекомендуется анализировать сыворотки с микробным проростом, гемолизом, повышенным содержанием липидов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

С контрольными и исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Оборудование, материалы и реагенты

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин, термостат на 37 °С, холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08.

2. Приготовление растворов и реагентов для ИФА

Все реагенты до начала анализа должны быть выдержаны не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С. Иммуносорбент выдерживать в упакованном виде, для того чтобы избежать конденсации влаги внутри лунок.

2.1. Приготовление раствора для отмывки планшетов (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) его необходимо прогреть перед разведением в термостате при 37°С до полного растворения осадка.

ФСБ-Т(х25) развести водой очищенной в 25 раз, используя объемы концентрата и воды очищенной, указанные в табл. 1 для заданного числа стрипов

Таблица 1

Кол-во стрипов	2	4	6	8	10	12
ФСБ-Т(х25), мл	7	13	20	27	33	40
Вода очищ., мл	до 175	до 325	до 500	до 675	до 825	до 1000

Раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

2.2. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Раствор готовить за 10-20 мин до внесения в лунки планшета.

Конъюгат развести в РРК, используя объемы конъюгата и РРК, указанные в табл. 2 для заданного числа стрипов. Необходимый объем РРК перенести в одноразовую емкость и добавить конъюгат в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 2

Кол-во стрипов	2	4	6	8	10	12
РРК, мл	2	4	6	8	10	12
Конъюгат, мкл						

Объем конъюгата, вносимый в РРК; указывается для каждой серии тест-системы.

Стабильность рабочего разведения конъюгата при температуре от 18 до 25 °С не более 6 ч.

2.3. Приготовление раствора хромогена

Готовить непосредственно перед использованием, избегая попадания прямых солнечных лучей.

ТМБ развести в ЦБР, используя объемы ТМБ и ЦБР, указанные в табл. 3 для заданного числа стрипов. Необходимый объем ЦБР перенести в одноразовую емкость и добавить ТМБ в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 3

Кол-во стрипов	2	4	6	8	10	12
ЦБР, мл	2	4	6	8	10	12
ТМБ, мкл	200	400	600	800	1000	1200

Стабильность раствора хромогена при температуре от 18 до 25 °С не более 6 ч. в защищенном от света месте.

Примечание: Посуду и наконечники пипеток, контактировавшие с раствором хромогена, отмывать без применения синтетических моющих средств.

2.4. Приготовление остальных реагентов

РРО перед использованием необходимо тщательно перемешать из-за возможного выпадения осадка. Иммуносорбент, К⁺, К⁻, стоп-реагент готовы к использованию.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

3. Проведение ИФА

3.1. Извлечь из упаковки рамку планшета и необходимое число стрипов каждой группы. Неиспользованные стрипы допускается хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Расположить стрипы в рамке, чередуя стрипы с core-антигеном и NS-антигеном в соответствии со схемой постановки.

Рекомендуемая схема постановки ИФА (на 12 стрипах)

	core	NS	core	NS	core	NS	core	NS	core	NS	core	NS
A	К ⁺	К ⁺	№6	№6	№14	№14	№22	№22	№30	№30	№38	№38
B	К ⁻	К ⁻	№7	№7	№15	№15	№23	№23	№31	№31	№39	№39
C	К ⁻	К ⁻	№8	№8	№16	№16	№24	№24	№32	№32	№40	№40
D	№1	№1	№9	№9	№17	№17	№25	№25	№33	№33	№41	№41
E	№2	№2	№10	№10	№18	№18	№26	№26	№34	№34	№42	№42
F	№3	№3	№11	№11	№19	№19	№27	№27	№35	№35	№43	№43
H	№4	№4	№12	№12	№20	№20	№28	№28	№36	№36	№44	№44
G	№5	№5	№13	№13	№21	№21	№29	№29	№37	№37	№45	№45

3.2. В каждую лунку внести по 80 мкл (или 30 мкл) РРО.

3.3 В одну лунку (напр., А) стрипа с каждой группой антигенов внести 20 мкл (или 70 мкл) К⁺, в две лунки (напр., В и С) – по 20 мкл (или 70 мкл) К⁻, в остальные лунки – по 20 мкл (или 70 мкл) исследуемых образцов, т.е. в соответствии с внесенным объемом РРО (п.1.3.2), затем тщательно перемешать пипетированием (не менее 3 раз) или на шейкере на малой скорости в течение 30 с (100об/мин), цвет РРО при этом должен измениться с сине-фиолетового на зеленый или с красного на желтый.

3.4. Планшет закрыть крышкой или пленкой и инкубировать в соответствии с выбранной процедурой:

процедура 1 – 30 мин при 37 °С на шейкере (500 об/мин);

процедура 2 – 1 ч при 37 °С в термостате.

3.5. По окончании инкубации аспирировать содержимое лунок и промыть лунки планшета четыре раза, добавляя в каждую лунку не менее 400 мкл рабочего промывочного раствора. Время между заполнением и аспирацией (замачивание) должно быть не менее 30 сек.

Рекомендуется использовать:

- режим отмытки с переполнением – «overflow» - с внесением в лунки по 600-700 мкл рабочего промывочного раствора;

- поперечную аспирацию раствора из лунок – режим «crosswise».

Необходимо следить за полной аспирацией после каждого цикла отмытки (остаточный объем в лунках не должен превышать 10 мкл).

Полностью удалить влагу из лунок, перевернув планшет на сухую чистую фильтровальную бумагу.

Сохранность иммуносорбента между операциями 15 минут.

3.6. Перемешать рабочий раствор конъюгата и внести его по 100 мкл в каждую лунку. Планшет закрыть крышкой и выдержать в течение 30 мин в термостате при температуре 37 °С.

3.7. Стрипы промыть ФСБ-Т 6 раз с использованием обычного промывающего устройства или 5 раз в режиме "overflow" (см. п. 3.5).

3.8. В каждую лунку внести по 100 мкл свежеприготовленного раствора хромогена, выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте (планшет не закрывать) или в термостате при температуре 37 °С в течение 20 мин. (планшет закрыть чистой защитной пленкой).

3.9. В каждую лунку (в той же последовательности, в которой вносился раствор хромогена) внести по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин, но не позднее чем через 10 мин, учесть результаты.

РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при соблюдении следующих условий:

оптическая плотность в лунках с K⁺ (ОП_{K⁺}) – не менее 0,5;

оптическая плотность в лунках с K⁻ (ОП_{K⁻}) – не более 0,25.

В противном случае исследование повторить

Для каждой группы антигенов рассчитать критическое значение ОП (ОП_{крит}) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{K-ср} + 0,150;$$

где ОП_{K-ср} – значение ОП в лунках с K⁻ соответствующего стрипа.

Результаты учитывать по каждой группе антигенов отдельно.

Образец учитывать как отрицательный (не содержащий антител к ВГС), если значение ОП в лунке с ним ниже ОП_{крит} для каждой группы антигенов.

Образец учитывать как положительный (содержащий антитела к ВГС), если значение ОП в лунке с ним выше или равно ОП_{крит} по обоим группам антигенов или только по группе структурных антигенов (core) ВГС.

Образцы с ОП, большей или равной ОП_{крит} только по группе неструктурных антигенов (NS) ВГС, считают неопределенными. Неопределенные образцы должны быть исследованы в других подтверждающих тестах (иммуноблоттинг, ПЦР-анализ) или повторным исследованием сыворотки (плазмы) крови данного пациента в системе "ИФА-ВГС" через 3-6 мес.

Для интерпретации результатов исследования сывороток можно использовать коэффициент позитивности (КП), который рассчитывается для каждого антигена по формуле:

$$КП = \frac{ОП_{иссл.сыв.}}{ОП_{крит.}}$$

Если КП больше 1, исследуемый образец расценивать как положительный. Результат анализа считать отрицательным при КП меньше 1 и неопределенным при $КП \geq 1$.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

Набор транспортируют при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК.

СВОДНАЯ ТАБЛИЦА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ РЕАГЕНТОВ

Кол-во стрипов	2	4	6	8	10	12
ФСБ-Т						
ФСБ-Т(х25), мл	7	13	20	27	33	40
Вода очищ., мл	до 175	до 325	до 500	до 675	до 825	до 1000
Рабочий раствор конъюгата						
РРК, мл	2	4	6	8	10	12
Конъюгат, мкл						
Рабочий раствор хромогена						
ЦБР, мл	2	4	6	8	10	12
ТМБ, мкл	200	400	600	800	1000	1200

Объем конъюгата, вносимый в РРК; указывается для каждой серии тест-системы.

**КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА
("ИФА-ВГС", комплект № 3)**

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в каждую лунку – по 80 мкл (или 30 мкл) РРО; в первые лунки первых стрипов с каждым антигеном внести по 20 мкл (или 70 мкл) К ⁺ , во вторые и третьи – по 20 мкл (или 70 мкл) К ⁻ , в остальные лунки – по 20 мкл (или 70 мкл) исследуемых образцов в зависимости от внесенного объема РРО
Инкубация	30 мин при 37 °С на шейкере (500 об/мин) или 1 ч при 37 °С, в термостате
Промыть	4 раза ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 100 мкл рабочего разведения конъюгата
Инкубация	30 мин, 37, °С в термостате
Промыть	6 раз ФСБ-Т (обычное промывающее устройство) или 5 раз в режиме "overflow"
Внести	по 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 18-25 °С или в термостате при температуре 37 °С в течение 20 мин
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» – по воздуху

Декабрь 2014 г