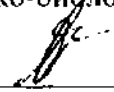


УТВЕРЖДАЮ

Директор ЗАО
«Медико-биологический Союз»


М.В. Лосев
«26» 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«Инвитролоджик ВГС-IgM»

Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител класса М к вирусу гепатита С

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Выявление антител класса М к вирусу гепатита С в сыворотке, плазме крови человека и препаратах, приготовленных из крови человека для использования в клинических и эпидемиологических исследованиях, а также службой крови.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Набор реагентов «Инвитролоджик ВГС-IgM» рассчитан на проведение 96 или 192 определений, включая контрольные образцы.

2.2 При исследовании небольшого количества образцов возможно проведение (для разборных планшетов) 12 или 24 независимых постановок ИФА по 8 анализов в каждой, включая контрольные образцы.

2.3 Принцип метода

Метод определения основан на двухстадийном твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) с применением смеси рекомбинантных антигенов (core, NS3, NS5), синтетического пептида NS4 вируса гепатита С (ВГС) и моноклональных антител мыши против IgM человека.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют с рекомбинантными антигенами ВГС, сорбированными на поверхности лунок планшета. При наличии в сыворотке специфических антител к ВГС происходит связывание их с антигеном, при этом образуются иммунные комплексы антиген-антитело. Несвязавшиеся компоненты исследуемого образца сыворотки удаляются из лунок планшета.

На второй стадии анализа специфические антитела выявляют с помощью конъюгата моноклональных антител против IgM человека с пероксидазой хрена.

После отмывки несвязавшихся компонентов конъюгата комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляют, добавляя в лунки планшета раствор хромогена.

Реакцию останавливают стоп-реагентом. На спектрофотометре измеряют интенсивность окрашивания раствора в лунках планшета. В лунках с более высоким содержанием антител класса М к ВГС в исследуемом образце интенсивность окрашивания раствора будет выше.

2.2 Состав набора

2.2.1 Состав комплекта I

Наименование компонента	Комплект I	
Иммуносорбент – смесь рекомбинантных антигенов и синтетических пептидов вируса гепатита С, сорбированная в лунках планшетов	разборный, 1 шт.	разделяемый по лункам. 1 шт.
K+ - положительный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, содержащая антитела класса М к вирусу гепатита С, не содержащая	1 фл. (2,0 мл)	1 фл. (2,0 мл)

антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, - прозрачная красного цвета жидкость		
К- - отрицательный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и HBs-антиген, - прозрачная желтого цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)
РБР-С - разводящий буферный раствор для сывороток - прозрачная фиолетового цвета жидкость	1 фл. (10,0 мл)	1 фл. (10,0 мл)
РК - раствор конъюгата - опалесцирующая зеленого цвета жидкость	1 фл. (12,0 мл)	1 фл. (12,0 мл)
РХ - раствор хромогена - прозрачная розового цвета жидкость	1 фл. (13,0 мл)	1 фл. (13,0 мл)
ФСБ-Т(х25) - 25-крат-ный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (26,0 мл)	1 фл. (26,0 мл)
Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (6,0 мл)	1 фл. (6,0 мл)
Инструкция по применению	1 шт.	1 шт.

2.2.2 Состав комплекта 2

Наименование компонента	Комплект 2	
Иммуносорбент - смесь рекомбинантных антигенов и синтетических пептидов вируса гепатита С, сорбированная в лунках планшетов	монолитный, 2 шт.	разборный, 2 шт.
К+ - положительный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, содержащая антитела класса М к вирусу гепатита С, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, - прозрачная красного цвета жидкость	1 фл. (2,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)
К- - отрицательный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и HBs-антиген, - прозрачная желтого цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)
РБР-С - разводящий буферный раствор для сывороток - прозрачная фиолетового цвета жидкость	1 фл. (20,0 мл) или 2 фл. (10,0 мл)	1 фл. (20,0 мл) или 2 фл. (10,0 мл)
РК - раствор конъюгата - опалесцирующая зеленого цвета жидкость	2 фл. (12,0 мл)	2 фл. (12,0 мл)
РХ - раствор хромогена - прозрачная розового цвета жидкость	2 фл. (13,0 мл)	2 фл. (13,0 мл)
ФСБ-Т(х25) - 25-крат-ный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином - прозрачная бесцветная жидкость	2 фл. (26,0 мл)	2 фл. (26,0 мл)
Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (12,0 мл)	1 фл. (12,0 мл)
Инструкция по применению	1 шт.	1 шт.

2.2.3 Состав комплекта 3

Наименование компонента	Комплект 3	
Иммуносорбент - смесь рекомбинантных антигенов и синтетических пептидов вируса гепатита С, сорбированная в лунках планшетов	разборный, 1 шт.	разборный, 2 шт.
К+ - положительный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, содержащая антитела класса М к вирусу гепатита С, не содержащая	1 фл. (3,0 мл)	2 фл. (3,0 мл)

антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2. - прозрачная красного цвета жидкость		
К- - отрицательный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ, ВИЧ-1, ВИЧ-2 и HBs-антиген, - прозрачная желтого цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	2 фл. (3,0 мл)
РБР-С - разводящий буферный раствор для сывороток - прозрачная фиолетового цвета жидкость	1 фл. (20,0 мл) или 2 фл. (10,0 мл)	2 фл. (20,0 мл) или 4 фл. (10,0 мл)
РК - раствор конъюгата - оналесцирующая зеленого цвета жидкость	1 фл. (20,0 мл) или 2 фл. (12,0 мл)	2 фл. (20,0 мл) или 4 фл. (12,0 мл)
РХ - раствор хромогена - прозрачная розового цвета жидкость	1 фл. (20,0 мл) или 2 фл. (13,0 мл)	2 фл. (20,0 мл) или 4 фл. (13,0 мл)
ФСБ-Т(х25) - 25-крат-ный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (50,0 мл) или 2 фл. (26 мл)	2 фл. (50,0 мл) или 4 фл. (26,0 мл)
Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (6,0 мл)	1 фл. (6,0 мл)
Инструкция по применению	1 шт.	1 шт.

Дополнительно в набор реагентов вкладывают: клейкую пленку для планшета, пластиковые емкости для растворов, одноразовые наконечники для дозаторов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Подлинность. Набор реагентов должен выявлять антитела класса М к вирусу гепатита С в положительных сыворотках рабочей панели «РП-АТ-(+/-)ВГС-IgM», аттестованной ОБТК предприятия, и не давать ложноположительных результатов при исследовании сывороток этой же панели, не содержащих антитела к ВГС.

3.2 Чувствительность. Степень способности набора реагентов выявлять положительные сыворотки рабочей панели «РП-АТ-(+/-)ВГС-IgM», методом ИФА без ложноотрицательных результатов - 100 %.

3.3 Специфичность. Степень способности набора реагентов выявлять отрицательные сыворотки рабочей панели «РП-АТ-(+/-)ВГС-IgM», методом ИФА без ложноположительных результатов - 100 %.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора реагентов - класс 2Б (ГОСТ Р 51609).

4.2 При работе с набором реагентов следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.3 Все компоненты набора реагентов, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания стоп-реагента на кожу и слизистые. В случае попадания промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.4 При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты (халат, шапочку или косынку, кожаные тапочки, одноразовые резиновые или пластиковые перчатки), т.к. контрольные образцы и исследуемые сыворотки следует рассматривать как потенциально инфицированные.

4.5 Твердые отходы, промывные растворы собрать в специальном контейнере и затем обработать дезсредствами, разрешенными в установленном порядке для применения на территории РФ, например, раствором перекиси водорода (ТУ 2123-002-57856778) с массовой долей 6 % при температуре от 17 °С до 27 °С не менее 2 ч.

4.6 Инструменты и оборудование, а также поверхности, на которых проводился анализ, обработать дезсредствами, разрешенными в установленном порядке для применения на территории РФ, например, раствором этилового спирта (ГОСТ Р 51652) с объемной долей 70 % в течение нескольких секунд.

4.7 Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами реагентов.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Устройство для промывки микропланшетов или восьмиканальная полуавтоматическая пипетка со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей до 300 мкл;

- пипетка полуавтоматическая одноканальная с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей от 40 до 200 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования с погрешностью не более 3 %;

- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;

- фотометр для микропланшетов, позволяющий проводить измерение оптической плотности растворов в лунках планшетов при длинах волн 450 и 650 нм;

- цилиндр мерный второго класса точности вместимостью 1000 мл;

- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от $2 ^\circ\text{C}$ до $8 ^\circ\text{C}$;

- перчатки резиновые хирургические;

- бумага фильтровальная лабораторная;

- вода очищенная;

- спирт этиловый;

- водорода перекись;

- перчатки резиновые.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Для проведения анализа использовать сыворотки, плазму крови человека объемом не менее 15 мкл.

6.2 Для анализа использовать сыворотку, плазму крови человека как свежеприготовленную, так и хранившуюся не более 48 ч при температуре от $2 ^\circ\text{C}$ до $8 ^\circ\text{C}$ или не более трех месяцев при температуре минус $20 ^\circ\text{C}$.

6.3 Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки готовить и хранить в условиях, исключающих возможность бактериального пророста. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования в течение 15 мин при частоте вращения 3000 об/мин. Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией. Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Несоблюдение описанных ниже требований может привести к искажению результатов анализа:

- при проведении анализа нельзя использовать реагенты из наборов реагентов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов;

- для приготовления растворов использовать чистую посуду;

- в процессе промывки полностью заполнять лунки планшета без переполнения и перетекания жидкости в соседние лунки;

- время между заполнением и опорожнением лунок планшета растворами и реагентами должно быть не менее 30 с;

- не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями;

- для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами использовать одноразовые наконечники для дозаторов;

- дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать раствором спирта этилового с объемной долей 70 %, не использовать хлорамин и другие хлорсодержащие вещества;

- при использовании промывателя следить за состоянием емкости для рабочего раствора ФСБ-Т и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста.

7.1 Подготовка компонентов набора

- Комплект перед проведением анализа выдержать в течение 30 мин при температуре от 17 °С до 27 °С.

- Содержимое флаконов с реагентами, входящими в состав набора реагентов, и исследуемые образцы перед проведением анализа тщательно перемешать.

7.1.1 Подготовка иммуносорбента

Иммуносорбент готов к использованию.

Хранение: после вскрытия упаковки - неиспользованные стрипы иммуносорбента хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 3 месяцев.

7.1.2 Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т (для промывки планшетов)

Внимание!

- Рабочий раствор ФСБ-Т готовить за 15 мин до проведения анализа.

- При выпадении во флаконе с ФСБ-Т(х25) осадка прогреть флакон с концентратом при температуре 37 °С до полного его растворения.

Содержимое флакона с ФСБ-Т(х25) разбавить в 25 раз водой очищенной и тщательно перемешать.

При постановке ИФА на отдельных стрипах иммуносорбента в мерный цилиндр отобрать необходимые объемы ФСБ-Т(х25) и воды очищенной в соответствии с таблицей 1.

Т а б л и ц а 1

Компонент		Количество используемых стрипов, шт.											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Объем, мл	комплект 1, комплект 2												
	ФСБ-Т(х25)	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	14,0	16,0	18,0	20,0	22,0	26,0
	Вода очищенная	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 650
	комплект 3												
	ФСБ-Т(х25)	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0	24,0	28,0	32,0	36,0	40,0	44,0	50,0
	Вода очищенная	до 100	до 200	до 300	до 400	до 500	до 600	до 700	до 800	до 900	до 1000	до 1100	до 1250

7.1.3 Подготовка РБР-С, РК и РХ

РБР-С, РК и РХ готовы к использованию.

Хранение: неиспользованные РБР-С, РК и РХ - в закрытых флаконах в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.4 Подготовка контрольных образцов

К+ и К- готовы к использованию.

Хранение: неиспользованные К- и К+ - в закрытых флаконах в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.5 Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: неиспользованный стоп-реагент - в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2 Проведение ИФА

- Время внесения контрольных и исследуемых образцов не должно превышать 5 - 10 мин.

• Необходимые для проведения анализа объемы РХ и РК перед внесением в лунки планшета перелить из флакона в отдельную емкость.

• При проведении анализа на одном или двух стрипах допускается использовать для внесения К- две лунки, для внесения К+ – одну лунку.

7.2.1 Проведение ИФА при ручной постановке (комплект 1, комплект 2)

7.2.1.1 Необходимое для проведения анализа число стрипов вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.1.2 В две лунки планшета внести по 100 мкл К+, в три другие лунки планшета – по 100 мкл К-. В остальные лунки планшета внести по 90 мкл РБР-С, затем по 10 мкл исследуемых сывороток.

Раствор перемешать пять раз пипетированием.

При необходимости допускается проведение оптического контроля точности внесения сывороток и РБР-С в лунки планшета (см. 7.3.1).

7.2.1.3 Планшет заклеить клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.1.4 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет пять раз рабочим раствором ФСБ-Т. Для этого внести в каждую лунку планшета раствор до полного заполнения, а затем удалить содержимое лунок в емкость с дезраствором. Остатки раствора удалить, активно постукивая перевернутым (лунками вниз) планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

7.2.1.5 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл РК.

При необходимости допускается проведение оптического контроля точности внесения РК в лунки планшета (см. 7.3.2).

7.2.1.6 Планшет заклеить клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.1.7 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет пять раз рабочим раствором ФСБ-Т, как описано в 7.2.1.4.

7.2.1.8 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл РХ.

При необходимости допускается проведение оптического контроля точности внесения РХ в лунки планшета (см. 7.3.3).

7.2.1.9 Планшет заклеить клейкой пленкой и поместить на 15 мин в защищенное от света место при температуре 37 °С.

7.2.1.10 Остановить реакцию внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

7.2.2 Проведение ИФА на автоматическом анализаторе открытого типа (комплект 3)

7.2.2.1 Необходимое для проведения анализа число стрипов вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.2.2 Залить рабочий раствор ФСБ-Т в предназначенную для него емкость анализатора.

7.2.2.3 Залить остальные рабочие растворы, реагенты, К+, К- и анализируемые сыворотки в специальные контейнеры.

7.2.2.4 Поместить в анализатор иммуносорбент.

7.2.2.5 Задать программу проведения ИФА:

Внесение растворов	Полный планшет	Постриповая постановка (1 или 2 стрипа)
	2 лунки – по 100 мкл К+ 3 лунки – по 100 мкл К- в остальные лунки - по 90 мкл РБР-С и по 10 мкл исследуемых сывороток	1 лунка – 100 мкл К+ 2 лунки – по 100 мкл К- в остальные лунки - по 90 мкл РБР-С и по 10 мкл исследуемых сывороток
Инкубация	30 мин при температуре 37 °С	
Промывка	5 раз рабочим раствором ФСБ-Т объемом от 300 до 400 мкл	
Внесение раствора	по 100 мкл РК	
Инкубация	30 мин при температуре 37 °С	

Промывка	5 раз рабочим раствором ФСБ-Т объемом от 300 до 400 мкл
Внесение раствора	по 100 мкл РХ
Инкубация	15 мин при температуре от 37 °С в защищенном от света месте
Внесение раствора	по 50 мкл стоп-реагента

7.2.2.6 Включить анализатор.

7.2.2.7 При необходимости в процессе проведения анализа допускается проведение оптического контроля точности внесения реагентов в лунки планшета (см. 7.3).

7.2.2.8 По окончании анализа прибор выдаст протокол результатов исследования.

7.3 Оптический контроль точности внесения реагентов в лунки планшета

7.3.1 Оптическая плотность (ОП) в лунках, содержащих сыворотки и РБР-С, должна быть более 0,500 о.е. при длине волны 620 нм.

7.3.2 ОП раствора в лунках после внесения РК должна быть более 0,300 о.е. при длине волны 450 нм.

7.3.3 ОП раствора в лунке после внесения РХ должна быть более 0,080 о.е. при длине волны 490 нм.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить ОП раствора в лунках планшета на спектрофотометре в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне от 620 до 700 нм. Допускается измерение ОП при одной длине волны – 450 нм. Нулевой уровень («бланк») установить по воздуху. Время между остановкой реакции и измерением ОП должно быть не более 40 мин.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты учитывать только в том случае, если:

1) среднее значение ОП лунках с К+ (ОПК+ср.) более 0,800 о.е.;

2) среднее значение ОП в лунках с К- (ОПК-ср.) менее 0,200 о.е.

ОПКрит. рассчитать по формуле 1

$$\text{ОПКрит.} = (\text{ОПК-ср.}) + 0,200, \quad (1)$$

где (ОПК-ср.) – среднее значение ОП (ОПК-) по трем (двум) лункам.

Исследуемую сыворотку расценивать как *положительную*, т.е. содержащую антитела класса М к вирусу гепатита С, если значение ОП исследуемой сыворотки равна или превышает ОПКрит.

Исследуемую сыворотку расценивать как *отрицательную*, т.е. не содержащую антитела класса М к вирусу гепатита С, если значение ОП исследуемой сыворотки ниже ОПКрит.

10 СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

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

Набор реагентов хранить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 °С до 8 °С в течение срока годности.

Транспортирование наборов реагентов производить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре не выше 27 °С в течение 5 суток.

Замораживание наборов реагентов не допускается.

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.
Для диагностики «in vitro».

Отзывы о качестве наборов направлять:

- в ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора РФ по адресу:
119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, 41; факс 8-(499)-241-92-38;
- на предприятие-изготовитель по адресу:
630117, г. Новосибирск – 117, а/я – 113, ЗАО «МБС»;
головной офис, тел./факс: 8-(383)-332-52-75;
отдел продаж, тел./факс: 8-(383)-332-81-38, 332-18-54, 339-91-97;
ОБТК, тел./факс: 8-(38341)-5-80-98, e-mail: obtk@mbu.ru

Зам. директора по научной работе
Московского Областного
Научно-исследовательского института
им.М.Ф.Владимирского (МОНИКИ)

