

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

12 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов классов G и M к индивидуальным белкам вируса гепатита C
(core, NS3, NS4, NS5)
«Бест анти-ВГС-спектр»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор «Бест анти-ВГС-спектр» предназначен для выявления иммуноглобулинов классов G и M к индивидуальным белкам вируса гепатита C (core, NS3, NS4, NS5) в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа, а также подтверждения положительных результатов ИФА, полученных при скрининге.

1.2. Набор рассчитан на проведение 24 исследований, включая контроли по выявлению иммуноглобулинов классов G и M к ВГС. Возможны 6 независимых постановок по 4 анализа каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантных антигенов. Во время первой инкубации, при наличии в исследуемых образцах антител к ВГС, они связываются с рекомбинантными белками, иммобилизованными на поверхности лунок планшета. Во время второй инкубации смесь пероксидазных конъюгатов антител к IgG человека и антител к IgM человека связывается с антителами, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Далее, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы «антиген-антитело». Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Интенсивность желтого окрашивания зависит от количества

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и нач. отделения ИФА гепатита С О.Н. Ястребовой

спектрофотометрический в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620 - 655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

2.2. Состав набора:

- планшет разборный с иммобилизованным рекомбинантными антигенами ВГС – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+) – 1 фл., 1,0 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^-) – 1 фл., 1,0 мл;
- конъюгат (антитела к IgM и IgG человека, меченные пероксидазой хрена), лиофилизированный – 1 фл. или 2 фл., или концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- раствор для предварительного разведения (РПР) при комплектации набора лиофилизированным конъюгатом – 1 фл., 3,0 мл;
- раствор для разведения сывороток (РС) – 1 фл., 10,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – 1 фл., 13,0 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28,0 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13,0 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 0,5-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов классов G и M к индивидуальным белкам вируса гепатита C (core, NS3, NS4, NS5) должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия (СПП ВГС 05-2-371), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», включающей образцы сывороток, содержащие антитела к ВГС: чувствительность по антителам к ВГС – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов классов G и M к индивидуальным белкам вируса гепатита C (core, NS3, NS4, NS5) должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия (СПП ВГС 05-2-371), аттестованной

ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», включающей образцы сывороток, не содержащие антитела к ВГС: специфичность по антителам к ВГС – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609-2000).

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113 от 29.10.98.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 655 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- термошейкер, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, интенсивность перемешивания 500-800 об/мин;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру $(2-8)^\circ\text{C}$;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2–8) °С не более 5 суток, либо при температуре минус (20 ± 3) °С, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать в течение 10–15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Внимание! *Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.*

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18–25) °С.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5 %.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник при температуре (2–8) °С.

При комплектации набора лиофилизированным конъюгатом, концентрированный раствор конъюгата должен быть приготовлен, как минимум, за 15 мин до его использования.

Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина.

Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25; СБР; концентрат ТМБ; стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Наконечники для пипеток (автоматических дозаторов) следует использовать однократно.

Запрещается повторное использование планшетов для предварительного нанесения сывороток.

Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (*четвертичных аммониевых соединений*), спиртов, третичных аминов (МУ-231-113 от 29.10.98).

Посуду (ванночки), используемые для работы с растворами конъюгата и тетраметилбензида, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента.

В случае повторного использования посуды (ванночки) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки) для раствора тетраметилбензида сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов.

7.2.1. Промывочный раствор.

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см. таблицу) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объема или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

Хранение: при температуре (2–8) °С до 5 суток.

7.2.2. Контрольные образцы

Контрольные образцы K^+ и K^- готовы к использованию.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре (2–8) °С не более 1 мес.

7.2.3. Растворы конъюгата.

При комплектовании набора лиофилизированным конъюгатом приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – до 1 месяца при температуре (2–8) °С.

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

Тщательно взболтать содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (РК). Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество (см. таблицу) концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

Конъюгат в рабочем разведении хранению не подлежит.

При комплектовании набора концентратом конъюгата, перед приготовлением рабочего разведения необходимо тщательно взболтать содержимое флакона. Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество (см. таблицу) концентрата конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием до получения равномерного окрашивания.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление промывочного раствора												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении для лиофилизированной формы												
Концентрированный раствор конъюгата, мкл	α^*	$2 \times \alpha$	$3 \times \alpha$	$4 \times \alpha$	$5 \times \alpha$	$6 \times \alpha$	$7 \times \alpha$	$8 \times \alpha$	$9 \times \alpha$	$10 \times \alpha$	$11 \times \alpha$	$12 \times \alpha$
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении для концентрата												
Конъюгат, концентрат, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Приготовление раствора ТМБ в рабочем разведении												
ТМБ (концентрат), мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
СБР, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

* α = ____ мкл (значение α указано в инструкции и в паспорте на данную серию наборов).

7.2.4. Раствор ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, прилагаемой к набору, непосредственно перед использованием. Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином.

В ванночку для реагентов отобрать необходимое количество ТМБ (см. таблицу), добавить соответствующее количество СБР, тщательно перемешать. При приготовлении раствора ТМБ следует исключить воздействие света.

Хранение: до 3 ч в защищенном от света месте при температуре (18–25)°С.

7.3. Проведение анализа

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при температуре (2–8) °С до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1), концентрированный раствор конъюгата, если набор укомплектован лиофилизированной формой конъюгата (п. 7.2.3).

7.3.2. Перед постановкой ИФА лунки стрипов промыть один раз промывочным раствором, полностью заполняя каждую лунку (400 мкл промывочного раствора), время экспозиции с раствором не менее 30 сек от начала заполнения первого ряда лунок. По окончании экспозиции раствор аккуратно удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге.

7.3.3. В лунках стрипов на рядах А, Е иммобилизован антиген, кодируемый структурной (core) областью генома, на рядах В, F иммобилизован антиген, соответствующий неструктурной области генома ВГС – NS3, на рядах С, G – NS4, на рядах D, H – NS5. Поэтому все контроли и исследуемые сыворотки вносят в 4 лунки вертикального ряда для проведения реакции с каждым антигеном отдельно согласно схеме.

Во все лунки стрипов внести по 60 мкл раствора для разведения сывороток (РС). В 4 лунки планшета внести по 40 мкл положительного контрольного образца (K⁺), в 4 лунки – по 40 мкл отрицательного контрольного образца (K⁻), а в остальные лунки – по 40 мкл цельных испытуемых сывороток (см. схему). Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).

Стрипы заклеить липкой пленкой и инкубировать в соответствии с выбранной процедурой:

процедура 1 – 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, шейкер (500 об/мин);

процедура 2 – 1 час при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ без использования шейкера.

За 5–10 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.3).

Схема постановки анализа

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Контроль K^-	Сыворотка №2	Сыворотка №4	Сыворотка №6	Сыворотка №8	Сыворотка №10	Сыворотка №12	Сыворотка №14	Сыворотка №16	Сыворотка №18	Сыворотка №20	Сыворотка №22	core
B													NS ₃
C													NS ₄
D													NS ₅
E	Контроль K^+	Сыворотка №1	Сыворотка №3	Сыворотка №5	Сыворотка №7	Сыворотка №9	Сыворотка №11	Сыворотка №13	Сыворотка №15	Сыворотка №17	Сыворотка №19	Сыворотка №21	core
F													NS ₃
G													NS ₄
H													NS ₅

7.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором.

При этом каждую лунку необходимо заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора).

Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

7.3.5. В каждую лунку внести по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении. Для внесения раствора конъюгата в рабочем разведении использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Стрипы заклеить липкой пленкой и инкубировать 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.3.6. По окончании инкубации промыть лунки 5 раз промывочным раствором и удалить влагу как описано выше (п. 7.3.4).

7.3.7. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении (п. 7.2.4).

Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении. Для внесения раствора ТМБ в рабочем разведении использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Стрипы инкубировать 20 мин при температуре (18–25) °С или 15 мин при температуре (37±1) °С в защищенном от света месте.

7.3.8. Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты измерить оптическую плотность (ОП).

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– значение оптической плотности в лунках с положительным контрольным образцом в лунках с каждым антигеном (core, NS3, NS4 и NS5) не менее 0,80 ($ОПК^+_{core}$, $ОПК^+_{NS3}$, $ОПК^+_{NS4}$, $ОПК^+_{NS5} \geq 0,80$);

– значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом в лунках с каждым антигеном (core, NS3, NS4 и NS5) не более 0,20 ($ОПК^-_{core}$, $ОПК^-_{NS3}$, $ОПК^-_{NS4}$, $ОПК^-_{NS5} \leq 0,20$).

Учет результатов проводится отдельно к каждому из четырех антигенов ВГС. ОП критическое ($ОП_{крит}$) для антигенов «core», «NS3», «NS4», «NS5» вычислить по формуле:

$$ОП_{крит}(core) = ОП K^-(core) + 0,2;$$

$$ОП_{крит}(NS3) = ОП K^-(NS3) + 0,2;$$

$$ОП_{крит}(NS4) = ОП K^-(NS4) + 0,2;$$

$$ОП_{крит}(NS5) = ОП K^-(NS5) + 0,2;$$

где $ОП K^-$ – оптическая плотность в лунках с K^- для каждого отдельного антигена.

Для интерпретации результатов исследования сывороток использовать коэффициент позитивности (КП), который высчитывают для каждого антигена в условных единицах:

$$КП (core) = ОП_{обр}(core) / ОП_{крит}(core);$$

$$КП (NS3) = ОП_{обр}(NS3) / ОП_{крит}(NS3);$$

$$\text{КП (NS4)} = \text{ОП}_{\text{обр}}(\text{NS4}) / \text{ОП}_{\text{крит}}(\text{NS4});$$

$$\text{КП (NS5)} = \text{ОП}_{\text{обр}}(\text{NS5}) / \text{ОП}_{\text{крит}}(\text{NS5});$$

где ОП_{обр} – оптическая плотность в лунках с исследуемыми сыворотками.

Исследуемую сыворотку расценивают как отрицательную, если соответствующие ей значения КП для каждого антигена меньше 1.

Исследуемую сыворотку расценивают как положительную, если соответствующие ей значения КП превышают или равны 1:

1) для антигена core;

или

2) для любых двух из четырех антигенов.

Исследуемый образец оценивают как неопределенный, если положительная реакция ($\text{КП} \geq 1$) получена только с одним из неструктурных антигенов.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

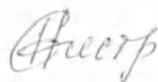
10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2–8) °С. Замораживание не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «Бест анти-ВГС-спектр» обращаться:
в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу: 630128, г. Новосибирск-128, а/я 102,
тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

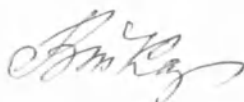
E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Нач. отделения ИФА гепатита С
ЗАО «Вектор-Бест»



О.Н. Ястребова

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Ректор ГБОУ ВПО
НГМУ Минздравсоцразвития России



И.О. Маринкин

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
10 листов



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов классов G и M к индивидуальным белкам вируса гепатита C
(core, NS3, NS4, NS5)
«Бест анти-ВГС-спектр»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор «Бест анти-ВГС-спектр» предназначен для выявления иммуноглобулинов классов G и M к индивидуальным белкам вируса гепатита C (core, NS3, NS4, NS5) в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа, а также подтверждения положительных результатов ИФА, полученных при скрининге.

1.2. Набор рассчитан на проведение 24 исследований, включая контроли по выявлению иммуноглобулинов классов G и M к ВГС. Возможны 6 независимых постановок по 4 анализа каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантных антигенов. Во время первой инкубации, при наличии в исследуемых образцах антител к ВГС, они связываются с рекомбинантными белками, иммобилизованными на поверхности лунок планшета. Во время второй инкубации смесь пероксидазных конъюгатов антител к IgG человека и антител к IgM человека связывается с антителами, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Далее, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы «антиген-антитело». Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Интенсивность желтого окрашивания зависит от количества

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и нач. отделения ИФА гепатита С О.Н. Ястребовой

содержащихся в исследуемом образце антител к ВГС. Учет результатов спектрофотометрический в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620 - 655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

2.2. Состав набора:

- планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВГС – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+) – 1 фл., 1,0 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^-) – 1 фл., 1,0 мл;
- конъюгат (антитела к IgM и IgG человека, меченные пероксидазой хрена), лиофилизированный – 1 фл. или 2 фл., или концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- раствор для предварительного разведения (РПР) при комплектации набора лиофилизированным конъюгатом – 1 фл., 3,0 мл;
- раствор для разведения сывороток (РС) – 1 фл., 10,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – 1 фл., 13,0 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28,0 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13,0 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 5-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов классов G и M к индивидуальным белкам вируса гепатита С (core, NS3, NS4, NS5) должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия (СПП ВГС 05-2-371), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», включающей образцы сывороток, содержащие антитела к ВГС: чувствительность по антителам к ВГС – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов классов G и M к индивидуальным белкам вируса гепатита С (core, NS3, NS4, NS5) должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия (СПП ВГС 05-2-371), аттестованной

ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», включающей образцы сывороток, не содержащие антитела к ВГС: специфичность по антителам к ВГС – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609-2000).

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113 от 29.10.98.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 655 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- термошейкер, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, интенсивность перемешивания 500-800 об/мин;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру $(2-8)^\circ\text{C}$;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2–8) °С не более 5 суток, либо при температуре минус (20 ± 3) °С, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать в течение 10–15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. *Внимание!* Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18–25) °С.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5 %.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник при температуре (2–8) °С.

При комплектации набора лиофилизированным конъюгатом, концентрированный раствор конъюгата должен быть приготовлен, как минимум, за 15 мин до его использования.

Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина.

Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25; СБР; концентрат ТМБ; стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Наконечники для пипеток (автоматических дозаторов) следует использовать однократно.

Запрещается повторное использование планшетов для предварительного нанесения сывороток.

Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (*четвертичных аммониевых соединений*), спиртов, третичных аминов (МУ-231-113 от 29.10.98).

Посуду (ванночки), используемые для работы с растворами конъюгата и тетраметилбензидина, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента.

В случае повторного использования посуду (ванночки) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки) для раствора тетраметилбензидина сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов.

7.2.1. Промывочный раствор.

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см. таблицу) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

Хранение: при температуре (2–8) °С до 5 суток.

7.2.2. Контрольные образцы

Контрольные образцы K^+ и K^- готовы к использованию.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре (2–8) °С не более 1 мес.

7.2.3. Растворы конъюгата.

При комплектовании набора лиофилизированным конъюгатом приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – до 1 месяца при температуре (2–8) °С.

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

Тщательно взболтать содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (РК). Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество (см. таблицу) концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

Конъюгат в рабочем разведении хранению не подлежит.

При комплектовании набора концентратом конъюгата, перед приготовлением рабочего разведения необходимо тщательно взболтать содержимое флакона. Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество (см. таблицу) концентрата конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием до получения равномерного окрашивания.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление промывочного раствора												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении для лиофилизированной формы												
Концентрированный раствор конъюгата, мкл	α^*	$2 \times \alpha$	$3 \times \alpha$	$4 \times \alpha$	$5 \times \alpha$	$6 \times \alpha$	$7 \times \alpha$	$8 \times \alpha$	$9 \times \alpha$	$10 \times \alpha$	$11 \times \alpha$	$12 \times \alpha$
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении для концентрата												
Конъюгат, концентрат, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Приготовление раствора ТМБ в рабочем разведении												
ТМБ (концентрат), мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
СБР, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

* α = ____ мкл (значение α указано в инструкции и в паспорте на данную серию наборов).

7.2.4. Раствор ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, прилагаемой к набору, непосредственно перед использованием. Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином.

В ванночку для реагентов отобрать необходимое количество ТМБ (см. таблицу), добавить соответствующее количество СБР, тщательно перемешать. При приготовлении раствора ТМБ следует исключить воздействие света.

Хранение: до 3 ч в защищенном от света месте при температуре (18–25)°C.

7.3. Проведение анализа

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при температуре (2–8) °C до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1), концентрированный раствор конъюгата, если набор укомплектован лиофилизированной формой конъюгата (п. 7.2.3).

7.3.2. Перед постановкой ИФА лунки стрипов промыть один раз промывочным раствором, полностью заполняя каждую лунку (400 мкл промывочного раствора), время экспозиции с раствором не менее 30 сек от начала заполнения первого ряда лунок. По окончании экспозиции раствор аккуратно удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге.

7.3.3. В лунках стрипов на рядах А, Е иммобилизован антиген, кодируемый структурной (core) областью генома, на рядах В, F иммобилизован антиген, соответствующий неструктурной области генома ВГС – NS3, на рядах С, G – NS4, на рядах D, H – NS5. Поэтому все контроли и исследуемые сыворотки вносят в 4 лунки вертикального ряда для проведения реакции с каждым антигеном отдельно согласно схеме.

Во все лунки стрипов внести по 60 мкл раствора для разведения сывороток (РС). В 4 лунки планшета внести по 40 мкл положительного контрольного образца (K^+), в 4 лунки – по 40 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), а в остальные лунки – по 40 мкл цельных испытуемых сывороток (см. схему). Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).

Стрипы заклеить липкой пленкой и инкубировать в соответствии с выбранной процедурой:

процедура 1 – 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, шейкер (500 об/мин);

процедура 2 – 1 час при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ без использования шейкера.

За 5–10 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.3).

Схема постановки анализа

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Контроль K^-	Сыворотка №2	Сыворотка №4	Сыворотка №6	Сыворотка №8	Сыворотка №10	Сыворотка №12	Сыворотка №14	Сыворотка №16	Сыворотка №18	Сыворотка №20	Сыворотка №22	core
B													NS ₃
C													NS ₄
D													NS ₅
E	Контроль K^+	Сыворотка №1	Сыворотка №3	Сыворотка №5	Сыворотка №7	Сыворотка №9	Сыворотка №11	Сыворотка №13	Сыворотка №15	Сыворотка №17	Сыворотка №19	Сыворотка №21	core
F													NS ₃
G													NS ₄
H													NS ₅

7.3.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором.

При этом каждую лунку необходимо заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора).

Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

7.3.5. В каждую лунку внести по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении. Для внесения раствора конъюгата в рабочем разведении использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Стрипы заклеить липкой пленкой и инкубировать 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.3.6. По окончании инкубации промыть лунки 5 раз промывочным раствором и удалить влагу как описано выше (п. 7.3.4).

7.3.7. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении (п. 7.2.4).

Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении. Для внесения раствора ТМБ в рабочем разведении использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Стрипы инкубировать 20 мин при температуре (18–25) °С или 15 мин при температуре (37±1) °С в защищенном от света месте.

7.3.8. Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты измерить оптическую плотность (ОП).

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– значение оптической плотности в лунках с положительным контрольным образцом в лунках с каждым антигеном (core, NS3, NS4 и NS5) не менее 0,80 ($ОПК^+_{core}$, $ОПК^+_{NS3}$, $ОПК^+_{NS4}$, $ОПК^+_{NS5} \geq 0,80$);

– значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом в лунках с каждым антигеном (core, NS3, NS4 и NS5) не более 0,20 ($ОПК^-_{core}$, $ОПК^-_{NS3}$, $ОПК^-_{NS4}$, $ОПК^-_{NS5} \leq 0,20$).

Учет результатов проводится отдельно к каждому из четырех антигенов ВГС. ОП критическое ($ОП_{крит}$) для антигенов «core», «NS3», «NS4», «NS5» вычислить по формуле:

$$ОП_{крит}(core) = ОП K^-(core) + 0,2;$$

$$ОП_{крит}(NS3) = ОП K^-(NS3) + 0,2;$$

$$ОП_{крит}(NS4) = ОП K^-(NS4) + 0,2;$$

$$ОП_{крит}(NS5) = ОП K^-(NS5) + 0,2;$$

где $ОП K^-$ – оптическая плотность в лунках с K^- для каждого отдельного антигена.

Для интерпретации результатов исследования сывороток использовать коэффициент позитивности (КП), который высчитывают для каждого антигена в условных единицах:

$$КП (core) = ОП_{обр}(core) / ОП_{крит}(core);$$

$$КП (NS3) = ОП_{обр}(NS3) / ОП_{крит}(NS3);$$

$$КП (NS4) = ОП_{обр}(NS4) / ОП_{крит}(NS4);$$

$$КП (NS5) = ОП_{обр}(NS5) / ОП_{крит}(NS5);$$

где $ОП_{обр}$ – оптическая плотность в лунках с исследуемыми сыворотками.

Исследуемую сыворотку расценивают как отрицательную, если соответствующие ей значения КП для каждого антигена меньше 1.

Исследуемую сыворотку расценивают как положительную, если соответствующие ей значения КП превышают или равны 1:

1) для антигена core;

или

2) для любых двух из четырех антигенов.

Исследуемый образец оценивают как неопределенный, если положительная реакция ($КП \geq 1$) получена только с одним из неструктурных антигенов.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2–8) °С. Замораживание не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «Бест анти-ВГС-спектр» обращаться: в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу: 630128, г. Новосибирск-128, а/я 102, тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Нач. отделения ИФА гепатита С
ЗАО «Вектор-Бест»

О.Н. Ястребова

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

«СОГЛАСОВАНО»

зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО

Минздравсоцразвития России



д.м.н., профессор В.В. Долгов

«04» 02 2014

Подпись:
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
10 листов

