

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2007 г. № _____

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

_____ 2007 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного выявления

иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита С

(РекомбиБест анти-ВГС – IgM)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита С в сыворотке (плазме) крови человека.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли (по 5 лунок в каждой постановке ИФА). Возможны 12 независимых постановок по 8 анализов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Активными компонентами набора являются рекомбинантные антигены ВГС, иммобилизованные в лунках планшетов, конъюгат (антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена), положительный и отрицательный контрольные образцы сывороток.

Способ определения IgM к ВГС представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови с иммобилизованными на поверхности лунок планшета рекомбинантными антигенами происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-антитело», который выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата.

Далее, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы «антиген-антитело».

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и зав. Лабораторией бактериальных инфекций С.А. Кротовым

Реакцию останавливают добавлением стоп-реактанта и измеряют оптическую плотность растворов в лунках в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 650 нм; или при длине волны 450 нм. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна количеству содержащихся в исследуемом образце IgM к ВГС.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании рассчитанного значения КП анализируемые образцы оцениваются как положительные или отрицательные.

2.2. Состав набора

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

- Планшет с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВГС – 1 шт;
- Положительный контрольный образец (K^+), инактивированный, лиофилизированный – 1 фл.;
- Отрицательный контрольный образец (K^-), инактивированный, лиофилизированный – 1 фл.;
- Конъюгат, лиофилизированный – 1 фл. или 2 фл.;
- Раствор для предварительного разведения (РПР) – 1 фл., 3,0 мл;
- Раствор для разведения сывороток (РС) – 1 фл., 13,0 мл;
- Раствор для разведения конъюгата (РК) – 1 фл., 13,0 мл;
- Тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28,0 мл;
- Субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13,0 мл;
- Стоп-реагент – 1 фл., 12,0 мл.

В комплект поставки дополнительно входят:

- Пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- Ванночка для реагентов – 2 шт.;
- Наконечники для пипетки на 4–200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором IgM к ВГС соответствует требованиям стандартной панели предприятия СПП (рег. № СОП 05-13): чувствительность и специфичность по IgM к ВГС – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При подготовке к проведению анализа следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы подвергать обработке 6 % раствором перекиси водорода (не менее 6 ч).

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

холодильник бытовой;

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 планшет;

перчатки резиновые хирургические;

бумага фильтровальная лабораторная;

цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;

цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

вода очищенная;

6% раствор перекиси водорода.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для внесения образцов в лунки стрипов следует использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре $(2-8) ^\circ\text{C}$ не более 5 суток, либо при температуре минус $(20 \pm 3) ^\circ\text{C}$, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифуговать 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 от 18 до 25 °С.

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

Контрольные образцы, концентрированный раствор конъюгата должны быть приготовлены, как минимум, за 15 мин до их использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами хранить при температуре от 2 до 8 °С, использовать в течение 1 мес.

Растворы ТМБ и конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Исключить воздействие света на раствор ТМБ.

При промывке лунки планшета заполнять полностью (300-400 мкл промывочного раствора в зависимости от типа планшета) и не касаться лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

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.

Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

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

Перекисью водорода (другие дезинфицирующие растворы не использовать) обрабатывать только наконечники для пипеток, используемые для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами. В случае их повторного использования, обеззараживать в 6% перекиси водорода (не менее 6 ч) с последующей 10-кратной промывкой в проточной воде, 3-кратной промывкой в дистиллированной воде и кипячением (40 мин) в последней из 3-х порций дистиллированной воды, чтобы избавиться от следов перекиси.

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с остальными реагентами, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента. В случае повторного использования посуду (ванночки), наконечники для пипеток промыть проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с ТМБ, в случае повторного использования, 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 концентратом 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 его дистиллированной водой до указанного в таблице объема.

Хранение: до 72 ч при температуре от 2 до 8 °С.

7.2.2. Контрольные образцы

Растворить лиофилизированные контрольные образцы K^+ и K^- добавлением в каждый флакон по 0,6 мл РПР.

Хранение: до 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

7.2.3. Раствор конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток.

Приготовить концентрированный раствор конъюгата путем растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – до 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить 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.

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												
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 ТМБ в рабочем разведении												
ТМБ, 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

$\alpha^* =$ _____ мкл

7.2.4. Раствор ТМБ в рабочем разведении

Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием! Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

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 при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

7.3. Проведение анализа

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся стрипы необходимо снять с рамки, поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой. Упакованные таким образом стрипы могут храниться до 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1), контрольные образцы (п. 7.2.2), концентрированный раствор конъюгата (п. 7.2.3).

Все растворы должны быть комнатной температуры (от 18 до 25 °С).

Перед использованием лунки планшета промыть один раз промывочным раствором, внося в каждую лунку не менее 300 мкл раствора. По окончании промывания влагу из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

7.3.2. Во все лунки стрипов внести по 80 мкл раствора для разведения сывороток (РС). В 2 лунки планшета внести по 20 мкл положительного контрольного образца (K^+), в 2 лунки – по 20 мкл отрицательного контрольного образца (K^-), 1 лунку оставить с РС (контроль конъюгата), в остальные лунки – по 20 мкл цельных испытуемых сывороток. *Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).*

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

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

7.3.3. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором с помощью вошера или вручную (используя многоканальную пипетку). При этом каждую лунку необходимо заполнять полностью (не менее 300 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.

7.3.4. В каждую лунку внести по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, прилагаемые к набору.

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

7.3.5. По окончании инкубации промыть лунки 5 раз промывочным раствором и удалить влагу, как описано выше (п. 7.3.3).

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

Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ.

Для внесения раствора тетраметилбензидина в рабочем разведении использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет инкубировать 30 мин при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) в защищенном от света месте.

7.3.7. 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 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Результаты исследований учитывать только в том случае, если средние значения ОП в лунках с контролем конъюгата и К⁻ не более 0,2, а в лунках с К⁺ более, чем на 0,4 превышает значение ОП_{ср}(К⁻).

По результатам ИФА рассчитать значение ОП_{крит}, по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}}(\text{К}^-) + 0,3,$$

где ОП_{ср}(К⁻) – среднее значение ОП для отрицательного контрольного образца.

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

$$\text{КП} = \text{ОП}_{\text{иссл. обр.}} / \text{ОП}_{\text{крит}},$$

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

Исследуемую сыворотку расценивают как отрицательную, если соответствующее ей значение КП меньше 1,0. Исследуемую сыворотку расценивают как положительную, если соответствующее ей значение КП превышает или равно 1,0.

10. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1. Наборы хранить и транспортировать при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

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

По вопросам, касающимся качества набора обращаться:

в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу: 630559, п. Кольцово, Новосибирской обл, Новосибирского района, а/я 121, тел. (383) 336-92-49, 227-60-30, 227-67-64, тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44, 336-73-46. E:mail: vbobtk@vector-best.ru,

и в Федеральное государственное учреждение науки Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу:

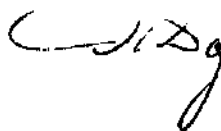
119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел. (495) 241-39-22.

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



О.Н. Ястребова

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов