

УТВЕРЖДЕНА

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

Директор ООО «Биопалитра»

Цыбин А.С.

«19» 05 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу гепатита С «Палитра ВГС-АТ скрин»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Палитра ВГС-АТ скрин» предназначен для выявления антител классов G и M к вирусу гепатита С в сыворотке и плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА). Рекомендуются для обследования доноров крови, органов, тканей человека и дифференциальной диагностики вирусных гепатитов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

«Палитра ВГС-АТ скрин» представляет собой набор реагентов, основой которого является разборный полистироловый планшет, в лунках которого сорбированы рекомбинантные антигены, аналогичные природным вирусам гепатита С (ВГС). Они соответствуют участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS₃, NS₄, NS₅) областью генома ВГС.

Основным свойством набора является способность выявлять в сыворотках (плазме) крови человека IgG и IgM, специфические к белкам ВГС. На первой стадии инкубации происходит их взаимодействие с сорбированными на поверхности лунок планшета рекомбинантными антигенами (при их наличии в исследуемом образце).

На второй стадии инкубации образовавшиеся комплексы «антиген-антитело» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата. Визуализация результата происходит при добавлении к комплексам «антиген-антитело-конъюгат» рабочего раствора хромогена. При этом развивается окрашивание раствора, интенсивность окрашивания прямо зависит от количества выявленных комплексов. Для учета результатов анализа с помощью планшетного сканера в лунки с рабочим раствором хромогена добавляют стоп-раствор.

Набор рассчитан на 96, 192 или 480 анализов, включая контрольные образцы. Для исследования малых партий образцов возможно поставить 12, 24 или 60 независимых иммуноферментных постановок по 8 анализов, включая контрольные образцы.

Набор комплектуется всеми необходимыми реагентами, кроме дистиллированной воды.

2.2. Состав набора

шифр	Наименование реагента	«Палитра ВГС-АТ скрин» -96, шт	«Палитра ВГС-АТ скрин» -192, шт	«Палитра ВГС-АТ скрин» -480, шт
Д1	Иммуносорбент - планшет разборный с сорбированными	1	2	5

	рекомбинантными антигенами, аналогичными природным ВГС			
Д2	Положительный контрольный образец, инактивированный, жидкость синего цвета - 1,5 мл	1	2	4
Д3	Отрицательный контрольный образец, инактивированный, жидкость желтого цвета - 3,0 мл	1	2	4
Д4	Раствор для разведения сывороток, прозрачная жидкость розового цвета - 11,0 мл	1	2	5
Д5	Раствор конъюгата (антитела к IgM и IgG человека, меченные пероксидазой хрена), готовый к применению, жидкость зеленого цвета - 11,0 мл	1	2	5
Д6-1	ТМБ, концентрат – хромоген тетраметилбензидин, бесцветная прозрачная жидкость - 0,5 мл	1	2	4
Д6-2	Цитрат-фосфатный раствор с перекисью водорода для хромогена, бесцветная прозрачная жидкость - 13,0 мл	1	2	4
Д7	Концентрат промывочного раствора 25-кратный (фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением твина), бесцветная прозрачная жидкость - 26,0 мл	1	2	5
Д8	Стоп-раствор, 0,9М раствор серной кислоты, бесцветная прозрачная жидкость – 6,0 мл	1	2	5
	Одноразовая пленка для заклеивания лунок иммуносорбента	3	6	15

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

ОКК производителя выявлено соответствие каждой серии «Палитра ВГС-АТ скрин» аналитическим и диагностическим характеристикам, которые являются критериями методики контроля качества изделия для потребителей:

3.1 Чувствительность. Все положительные образцы «Стандарт АТ(+/-)ВГС» (ОСО 42-28-310-02П) или рабочей панели образцов предприятия, содержащих и не содержащих антитела классов М и G к вирусу гепатита С «РП АТ(+/-) ВГС» должны интерпретироваться как положительные. При выполнении этого условия считать чувствительность равной 100%.

3.2 Специфичность. Все отрицательные образцы «Стандарт АТ(+/-)ВГС» или «РП АТ(+/-) ВГС» должны интерпретироваться как отрицательные. При выполнении этого условия считать специфичность равной 100%.

3.3 Воспроизводимость. Установлена исследованием коэффициента вариации оптических плотностей (ОП) одного и того же положительного образца. Коэффициент вариации не более 10 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2 При работе с набором 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 реагенты набора, за исключением Д8, являются нетоксичными. Серная кислота, входящая в состав реагента Д8, обладает раздражающим действием. При попадании реагента Д8 на кожу и слизистые промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.4 При работе с исследуемыми и контрольными образцами рассматривать их как потенциально инфекционный материал и использовать средства индивидуальной защиты (халат, шапочку или косынку, кожаные тапочки, одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, защитные очки), не пипетировать растворы ртом.

4.5 Все использованные материалы, инструменты и оборудование, рабочее место дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113.

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Пипетки со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования с погрешностью не более 3 %;
 - цилиндр мерный второго класса точности вместимостью 1000 мл;
 - бумага фильтровальная лабораторная;
 - вода очищенная;
 - анализатор автоматический открытого типа,
- или:
- многоканальная полуавтоматическая пипетка со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей до 400 мкл или устройство для промывки иммуносорбента Д1 промывочным раствором;
 - термостатируемый шейкер с частотой вращения до 700 об/мин, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ или термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
 - планшетный ридер, позволяющий проводить измерение оптической плотности растворов в лунках планшетов при длинах волн 450 и 620 - 700 нм.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Минимальный объем исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови не менее 10 мкл.

Желательно исследование свежих образцов. Допустимо использование образцов, хранившихся при температуре от 2°C до 8°C не более семи суток либо при температуре от минус 23°C до минус 17°C не более шести месяцев.

Образцы, содержащие взвешенные частицы, перед исследованием следует центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин для исключения неправильного результата анализа.

Проросшие, гемолизированные, гиперлипидные образцы, а также и более чем однократно подвергшиеся заморозке — оттаиванию, исследованию не подлежат.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Несоблюдение описанных ниже требований может привести к искажению результатов анализа.

- 7.1.1 При проведении анализа нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических реагентов (Д6-2, Д7, Д8), которые взаимозаменяемы во всех наборах производства ООО «Биопалитра». Не использовать реагенты с истекшим сроком годности.
- 7.1.2 Для приготовления рабочего раствора хромогена использовать одноразовые емкости и наконечники для дозаторов. Мерный цилиндр и емкость для приготовления промывочного раствора, многоразовые емкости для подготовки реагентов к работе должны быть тщательно вымыты и промыты дистиллированной водой, желательна их стерилизация.
- 7.1.3 При ручной промывке полностью заполнять лунки иммуносорбента Д1 (от 380 до 400 мкл в лунку), не допуская переливания промывочного раствора через края лунок, и не касаясь лунок наконечниками. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок. При использовании автоматического устройства для промывки микропланшетов рекомендуется использовать режим отмывки с переполнением «Overflow» (с внесением в лунки иммуносорбента Д1 от 600 до 700 мкл промывочного раствора) и режим окончательной аспирации «Crosswise».
- 7.1.4 Не допускать высыхания лунок иммуносорбента Д1 между отдельными операциями.
- 7.1.5 Ванночки, используемые для работы с реагентом Д5 и рабочим раствором хромогена не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами. При повторном использовании ванночку для реагента Д5 промыть проточной водой и тщательно ополоснуть водой очищенной. При повторном использовании ванночку для рабочего раствора хромогена сразу после работы промыть 50% раствором этилового спирта и тщательно ополоснуть водой очищенной. Никогда не использовать одну и ту же ванночку для Д5 и рабочего раствора хромогена.
- 7.1.6 При использовании промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста. Раз в неделю желательна емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.
- 7.1.7 Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только раствором 70 % этилового спирта, не использовать во время проведения ИФА перекись водорода, хлорамин и другие хлорсодержащие вещества.
- 7.1.8 Для дезинфекции отходов реагентов набора, вспомогательных материалов и исследуемых образцов рекомендуется использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА (не содержащие активный кислород и хлор, ионы тяжелых металлов), например средства на основе спиртов, третичных аминов или четвертичных аммониевых соединений.
- 7.1.9 Пленка для заклеивания лунок иммуносорбента является одноразовой и

повторному использованию после снятия не подлежит. При использовании части набора необходимо отрезать кусок пленки нужного размера для каждой стадии инкубации.

7.2 Приготовление реагентов

7.2.1 Приготовление иммуносорбента Д1

Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся вынуть из рамки и упаковать в пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыв пластиковую застежку.

Хранение: неиспользованные стрипы иммуносорбента Д1 в пакете с влагопоглотителем в течении срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2.2 Приготовление промывочного раствора

Взболтать содержимое флакона с Д7. При выпадении солей прогреть в термостате при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество Д7, развести его водой очищенной согласно Таблицы 1 и тщательно перемешать. При использовании целого флакона Д7 развести его содержимое до 650 мл водой очищенной и тщательно перемешать.

Хранение: промывочный раствор не более 12 ч при температуре от 17 °С до 27 °С, не более семи суток при температуре от 2 °С до 8 °С. Неиспользованный Д7 в закрытом флаконе в течении срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

Таблица 1. Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
На приготовление промывочного раствора												
Д7, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Вода очищенная, 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
Готовые к применению реагенты												
Д4, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	10,5	11,0
Д5, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	10,5	11,0
Д8, мл	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
На приготовление рабочего раствора хромогена												
Д6-1, мкл (V – объем реагента Д6-1 из расчета на целый флакон Д6-2. Указан на флаконе и в Паспорте серии)	1/13 V	2/13 V	3/13 V	4/13 V	5/13 V	6/13 V	7/13 V	8/13 V	9/13 V	10/13 V	11/13 V	12/13 V
Д6-2, 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

7.2.3 Приготовление реагентов Д4, Д5, Д8

Реагенты Д4, Д5, Д8 готовы к применению.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать в ванночку необходимое количество согласно Таблицы 1. При использовании целого набора вылить в ванночку все содержимое флакона.

Хранение: неиспользованные реагенты Д4, Д5, Д8 в закрытых флаконах в

течении срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2.4 Приготовление контрольных образцов Д2 и Д3

Д2 и Д3 готовы к применению.

Для использования отобрать пипеткой с новым сменным наконечником необходимые объемы из флаконов.

Хранение: неиспользованные Д2 и Д3 в закрытых флаконах в течении срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2.5 Приготовление рабочего раствора хромогена

Рабочий раствор хромогена готовить в ванночке с учетом требований 7.1.5 за пять - десять минут перед внесением в лунки Д1 с использованием новых сменных наконечников. Избегать попадания под прямые солнечные лучи.

В ванночку отобрать необходимый объем Д6-1 в зависимости от количества используемых стрипов согласно Таблицы 1. Добавить к нему соответствующий объем Д6-2, тщательно перемешать.

Хранение: рабочий раствор хромогена не более 10 мин до использования при температуре от 17 °С до 27 °С, неиспользованные Д6-1 и Д6-2 в закрытых флаконах в течении срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.3 Проведение иммуноферментного анализа

Перед постановкой реакции все реагенты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 17 °С до 27 °С.

7.3.1 Внести во все предназначенные для исследуемых образцов лунки Д1 по 90 мкл реагента Д4. В одну лунку дополнительно внести 100 мкл реагента Д4 для контроля правильной работы раствора конъюгата Д5 и рабочего раствора хромогена.

Внесение положительного и отрицательного контролей: в одну любую пустую лунку внести 100 мкл Д2, в две другие пустые лунки внести по 100 мкл Д3. При постановке ИФА на одном или двух стрипах такая схема постановки контролей обязательна. При одновременной постановке анализа на двух и более планшетах такая схема постановки контролей обязательна для каждого планшета.

В лунки с 90 мкл реагента Д4 внести по 10 мкл исследуемых образцов, тщательно перемешав пипетированием. Все лунки Д1 заклеить пленкой.

Д1 инкубировать 20 мин в термостатируемом шейкере при частоте шейкирования 700 об/мин и температуре (37±1) °С.

Допускается инкубирование 45 мин в термостате при температуре (37±1) °С.

7.3.2 По окончании инкубации содержимое лунок Д1 собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором и удалить влагу как описано в 7.1.3 и 7.1.4.

7.3.3 Во все лунки Д1 внести по 100 мкл реагента Д5. При ручной постановке учитывать требования 7.1.5. Все лунки Д1 заклеить пленкой.

Д1 инкубировать 20 мин в термостатируемом шейкере при частоте шейкирования 700 об/мин и температуре (37±1) °С.

Допускается инкубирование 45 мин в термостате при температуре (37±1) °С.

7.3.4 По окончании инкубации содержимое лунок Д1 собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором и удалить влагу как описано в 7.1.3 и 7.1.4.

7.3.5 Приготовить рабочий раствор хромогена как описано в 7.2.5.

Во все лунки иммуносорбента внести по 100 мкл рабочего раствора хромогена. При ручной постановке учитывать требования 7.1.5. Все лунки Д1 заклеить

енкой.

Защищенный от света **Д1** инкубировать 15 мин в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

3.6 Реакцию остановить добавлением во все лунки **Д1** по 50 мкл реагента **Д8**.

Время между остановкой реакции и регистрацией результатов не должно превышать 10 мин.

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью планшетного ридера, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр — 450 нм, референс-фильтр — в диапазоне 620-700 нм.

Допустима регистрация результатов только с основным фильтром 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Результаты анализа учитывать только при соблюдении следующих условий.

9.1 Каждое значение ОП в лунках с **Д3** (ОП **Д3**) менее 0,200.

9.2 Значение ОП в лунке с контролем **Д5** и **Д6** (ОП **Д5+6**) менее 0,150.

9.3 Значение ОП в лунке с **Д2** (ОП **Д2**) более 0,500.

По результатам анализа рассчитать значение критической оптической плотности (ОП_{крит.}) по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит.}} = \text{ОП}_{\text{ср.Д3}} + 0,25 \quad (1)$$

где ОП_{ср.Д3} - среднее значение двух (ОП **Д3**).

Для интерпретации результатов анализа использовать коэффициент позитивности (КП):

$$\text{КП} = \text{ОП}_{\text{ИО}} / \text{ОП}_{\text{крит.}} \quad (2)$$

где ОП_{ИО} — ОП исследуемого образца.

Если $\text{КП} \leq 1$, результат интерпретировать как отрицательный.

Если $\text{КП} > 1$, результат интерпретировать как положительный.

При обнаружении положительного образца исследовать его повторно в двух лунках этого же набора для исключения технической ошибки. При воспроизведении положительного результата хотя бы в одной лунке повтора, образец исследовать в подтверждающем анализе.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Срок годности набора реагентов «Палитра ВГС-АТ скрин» 12 месяцев.

Набор реагентов «Палитра ВГС-АТ скрин» хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C в соответствии с СП 3.3.2.1248-03. Допускается транспортирование при температуре до 27°C не более пяти суток. Не допускать замораживания.

Для диагностики «in vitro».

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «Палитра ВГС-АТ скрин» направлять
в ООО «Биопалитра» по адресу:
633011 Новосибирская область г. Бердск, ул. Попова д.11 к.3
тел. 8-383-336-45-21
E-mail: info@biopalitra.com

Ответственный за выпуск
набора реагентов в ООО «Биопалитра»



Дыбин А.С.

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»



А.Н.Сергеев

06

2012 г.