

Приказом Росздравнадзора
от 01.05.2011 г. № 5511-пр/н

Первый заместитель
генерального директора
ФГУП «НПО «Микроген»
Минздравсоцразвития России
П.В. Смачков
«22» 05 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

ИФА-анти-ВГС

Тест-система иммуноферментная для выявления антител
к вирусу гепатита С

Набор реагентов ИФА-анти ВГС Тест-система иммуноферментная для выявления антител к вирусу гепатита С выпускается в двух комплектациях (набор №1 и набор № 2) и включает следующие реагенты для проведения непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА):

Таблица 1

Реагенты	Описание
1	2
Иммуносорбент – смесь синтетических и рекомбинантных HCV-антигенов, сорбированных в лунках планшета для ИФА	96-луночные разборные или цельные планшеты для ИФА из прозрачного бесцветного полистирола, сорбированные HCV-антигенами
Конъюгат (x51 концентрат) - моноклональные антитела мыши против IgG человека, меченные пероксидазой хрена	Прозрачная жидкость сине-зелёного цвета
K ⁺ - контрольный положительный образец инаktivированный	Прозрачная жидкость красного цвета
K ⁻ - контрольный отрицательный образец инаktivированный	Прозрачная жидкость жёлтого цвета
РИП - разбавитель исследуемых проб	Прозрачная жидкость сине-фиолетового цвета
ФСР-Т (x25 концентрат) - фосфатно-солевой буферный раствор с твином-80	Прозрачная или опалесцирующая жидкость бесцветная или жёлтоватого цвета, допускается выпадение бесцветного кристаллического осадка

Продолжение таблицы 1

1	2
ЦБ – цитратный буферный раствор, содержащий H ₂ O ₂	Прозрачная бесцветная жидкость
ТМБ (x5 концентрат) – раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в димексиде	
Стоп-реагент – 1 М раствор кислоты серной	

Набор №1 рассчитан на проведение 192 определений, набор №2 рассчитан на проведение 96 определений, включая контрольные.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления антител к вирусу гепатита С в сыворотке (плазме) крови человека и препаратах крови.

Принцип метода

В основе метода лежит принцип непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления антител класса IgG к антигенам вируса гепатита С.

При внесении исследуемых или контрольных образцов в лунки планшета, антитела к вирусу гепатита С (анти-ВГС), в случае их наличия в образце, связываются с антигенами, иммобилизованными на твердой фазе, образуя иммунный комплекс антиген-антитело. Не связавшиеся антитела удаляют промыванием лунок. Внесение пероксидазного конъюгата моноклональных антител к IgG человека приводит к образованию комплекса антиген-антитело-конъюгат, на поверхности лунок планшета. Избыток конъюгата удаляют промыванием. Для выявления образовавшегося комплекса в лунки добавляют бесцветный субстратный раствор, в состав которого входит водорода перекись и хромоген (ТМБ). В результате ферментативной реакции из водорода перекиси выделяется кислород, который переводит хромоген в окрашенную форму. Ферментативную реакцию останавливают внесением раствора кислоты серной. Измеряют

63
оптическую плотность (ОП), величина которой зависит от концентрации анти-ВГС в образце.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Меры предосторожности

Входящие в набор реагентов контрольные образцы инаktivированы. Однако исследуемая сыворотка и плазма крови людей, а также растворы, оборудование и материалы, находящиеся с ними в контакте представляют собой потенциально инфекционный материал, и обращаться с ним следует осторожно: при работе использовать резиновые перчатки; оборудование, находившееся в контакте с биологическими образцами и реагентами, дезинфицировать до и после работы спирта этилового раствором 70 %; все использованные материалы обеззараживать водорода перекиси раствором 6 % или хлорамина Б раствором 3 % в течение 2 ч, или автоклавированием при $(2,0 \pm 0,1)$ кгс/см² ($(0,20 \pm 0,01)$ МПа), температуре (132 ± 2) °С в течение 60 мин; при работе с растворами ТМБ и кислоты серной не использовать пипетки с металлическими частями и избегать попадания этих растворов на кожный покров. Загрязненные участки кожи и слизистые оболочки обильно промывать водой.

Дополнительные материалы и оборудование

Материалы: ванночки для реагентов; вата гигроскопичная; вода дистиллированная или деионизированная; крышки или липкая плёнка для закрывания планшетов; мерный стакан или цилиндр вместимостью 1000 мл; наконечники одноразовые вместимостью 0,5-300 мкл, 100-1000 мкл, 1-5 мл, 2-10 мл; перчатки резиновые; растворы для обеззараживания: хлорамина Б раствор 3%, водорода перекиси раствор 6 %, спирта этилового раствор 70 %; флаконы стеклянные или пластиковые вместимостью 10, 20 мл с резиновыми или пластиковыми пробками.

Оборудование: анализатор иммуноферментный с тест-фильтром 450 нм и референс-фильтром 620-680 нм; дозаторы пипеточные для

внесения жидкостей: 1-канальные с переменным объёмом от 5 до 50 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл, от 1 до 5 мл, от 2 до 10 мл и 8-канальные с переменным объёмом от 50 до 300 мкл; контейнеры для обеззараживания твердых и жидких отходов; промыватель планшетов автоматический; термостат с рабочей температурой 37 °С.

Требования к образцам

Исследуемые образцы транспортировать и хранить при температуре от 2 °С до 8 °С. Если образцы сыворотки или плазмы не могут быть исследованы в течение 3 сут, их следует заморозить и хранить при температуре не выше минус 18 °С не более 1 года. Замороженные образцы перед использованием разморозить на воздухе при комнатной температуре. Перед использованием образцы тщательно перемешать путем встряхивания. Повторное замораживание не допускается.

При исследовании образцов с выраженным гемолизом, хилезом, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, могут быть получены ложноположительные или ложноотрицательные результаты ИФА.

Подготовка реагентов для ИФА

Таблица 2

Приготовление рабочих растворов концентрированных реагентов

Кол-во стрипов	Рабочий раствор ФСР-Т		Рабочий раствор конъюгата		Субстратный раствор	
	ФСР-Т x25 концентрат, мл	Вода дистиллированная, мл	Конъюгат x51 концентрат, мл	Рабочий раствор ФСР-Т, мл	ТМБ x5 концентрат, мл	ЦБ, мл
1	2	3	4	5	6	7
1	2,5	60,0	0,02	1,0	0,2	0,8
2	5,0	120,0	0,04	2,0	0,4	1,6
3	7,5	180,0	0,06	3,0	0,6	2,4
4	10,0	240,0	0,08	4,0	0,8	3,2
5	12,5	300,0	0,10	5,0	1,0	4,0
6	15,0	360,0	0,12	6,0	1,2	4,8

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7
7	17,5	420,0	0,14	7,0	1,4	5,6
8	20,0	480,0	0,16	8,0	1,6	6,4
9	22,5	540,0	0,18	9,0	1,8	7,2
10	25,0	600,0	0,20	10,0	2,0	8,0
11	27,5	660,0	0,22	11,0	2,2	8,8
12	30,0	720,0	0,24	12,0	2,4	9,6

Все компоненты перед использованием выдержать не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С. В случае выпадения кристаллов солей в ФСР-Т (x25 концентрат), прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка. Растворы готовить в зависимости от количества используемых стрипов иммуносорбента в соответствии с таблицей.

Рабочий раствор ФСР-Т хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут. Рабочий раствор конъюгата и субстратный раствор готовить непосредственно перед применением. Не хранить. К⁺, К⁻, РИП и Стоп-реагент готовы к использованию.

После отбора необходимого количества оставшиеся концентраты реагентов и неиспользованные стрипы хранить плотно закрытыми в пакете в течение срока годности при температуре от 2 до 8 °С.

Подготовка к исследованию препаратов крови

Лиофилизированные препараты крови перед исследованием растворить в дистиллированной воде (если иное не указано в ФСП на препарат) и довести объем до номинального.

Все препараты иммуноглобулинов перед исследованием дополнительно развести рабочим раствором ФСР-Т до конечной концентрации белка:

- 10±1 мг/мл (для иммуноглобулинов внутривенного введения),
- 5±0,25 мг/мл (для иммуноглобулинов внутримышечного введения),
- 5±0,4 мг/мл (для иммуноглобулинов энтерального применения).

Растворенные препараты крови хранению не подлежат.

Проведение ИФА

Иммуносорбент перед использованием промыть 2 раза рабочим раствором ФСР-Т, заполняя лунки до краёв и удаляя промывающий раствор в ёмкость с дезинфицирующим раствором.

Во все лунки внести по 100 мкл РИП, добавить по 20 мкл контрольных или исследуемых образцов и перемешать пипетированием. При этом цвет раствора в лунках (за исключением K^+) должен измениться с сине-фиолетового на сине-зеленый. При использовании 1 стрипа иммуносорбента контрольные образцы вносить каждый в 1 лунку. При использовании большего количества стрипов контрольные образцы внести не менее чем в 2 лунки каждый.

Планшет закрыть липкой лентой или крышкой и инкубировать при температуре 37 °С в течение 30-40 мин, затем промыть 5 раз как описано выше.

Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, планшет закрыть липкой лентой или крышкой и инкубировать при температуре 37 °С в течение 30-40 мин, затем промыть 5 раз как описано выше.

Во все лунки внести по 100 мкл субстратного раствора, выдержать в течение 10-15 мин при температуре от 18 до 25 °С в защищённом от света месте, затем добавить по 50 мкл стоп-реагента и не позднее чем через 5 мин учесть результаты ИФА.

Учет и интерпретация результатов

Провести измерение оптической плотности (ОП) раствора в лунках иммуносорбента с помощью анализатора иммуноферментного при двух длинах волн. Тест-фильтр – 450 нм, референс-фильтр – 620-680 нм. Допускается одноволновое измерение при 450 нм.

Результаты оценивать, если среднее значение ОП в лунках с K^- ($ОП_{cp.K^-}$) не превышает 0,150, в лунках с K^+ - не менее 1,000.

Исследуемые образцы, ОП которых не выше критического значения $ОП_{крит.}$, оценивать как отрицательные. Образцы, ОП которых выше $ОП_{крит.}$, оценивать как положительные. Значение $ОП_{крит.}$ вычислять по формуле:

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср.К} + 0,150$$

ФОРМА ВЫПУСКА

Набор реагентов выпускается в двух комплектациях.

Набор № 1 включает: ИММУНОСОРБЕНТ - 2 планшета; КОНЬЮГАТ (х51 концентрат) - 1 фл./проб., 0,5 мл; K^+ -1 фл. 1 фл./проб., 0,25 мл; K^- -1 фл./проб., 0,25 мл; РИП-1 фл., 20 мл; ФСР-Т (х 25 концентрат) - 2 фл. по 30 мл; ЦБ - 2 фл. по 10 мл; ТМБ (х5 концентрат) - 1 фл., 5 мл; СТОП-РЕАГЕНТ - 1 фл., 10 мл; упакованные в картонную коробку, в которую вложена инструкция по применению.

Набор № 2 включает: ИММУНОСОРБЕНТ - 1 планшет; КОНЬЮГАТ (х51 концентрат) - 1 фл./проб., 0,25 мл; K^+ -1 фл./проб., 0,25 мл; K^- -1 фл./проб., 0,25 мл; РИП-1 фл., 10 мл; ФСР-Т (х 25 концентрат) - 1 фл., 30 мл; ЦБ - 1 фл., 10 мл; ТМБ (х5 концентрат) - 1 фл., 2,5 мл; СТОП-РЕАГЕНТ - 1 фл., 6 мл; упакованные в картонную коробку, в которую вложена инструкция по применению.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Хранение в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте. Замораживание не допускается.

Транспортирование в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 2-х недель. Замораживание не допускается.

Срок годности – 6 месяцев. По истечению срока годности набор реагентов использованию не подлежит.

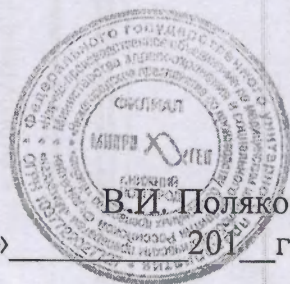
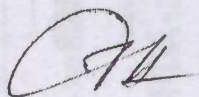
Условия отпуска. Для диагностики «in vitro». Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество тест-системы направлять в адрес предприятия изготовителя ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России, 115088, г. Москва, ул. 1-ая Дубровская, д. 15, тел. (495) 710-37-87.

Адрес производства: Россия, 603950, Нижегородская область, г. Нижний Новгород, ул. Грузинская, 44, тел. (831) 434-42-77.

Ответственный за производство:

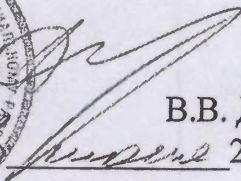
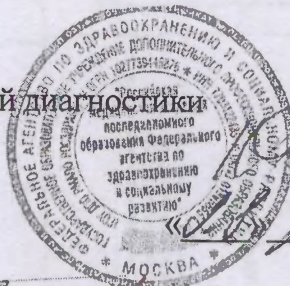
Директор
филиала ФГУП «НПО Микроген»
Минздравсоцразвития России
в г. Н.Новгород



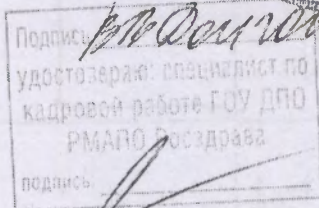
В.И. Поляков
«___» _____ 201__ г.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»
д.м.н, профессор



В.В. Долгов
«___» _____ 201__ г.



прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

2 листа (ов)

КОПИЯ ВЕРНА

Начальник управления
регистрации и медико-прав
исследований
А.Е. Ершов

