

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного
выявления иммуноглобулинов
классов G и M к индивидуальным
белкам вируса гепатита С
(core, NS3, NS4, NS5)

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

НАБОР РЕАГЕНТОВ

D-0774

Бест анти-ВГС – спектр

«Бест анти-ВГС – спектр» представляет собой набор реагентов, основой которого являются рекомбинантные антигены ВГС, соответствующие участкам белков, кодируемых структурной (*core*) и неструктурной (*NS3, NS4, NS5*) областью генома ВГС, иммобилизованные на поверхности лунок разборного полистиролового планшета отдельно.

Основным свойством набора является способность выявлять в сыворотках (*плазме*) крови человека антитела (*IgG и IgM*) к разным антигенам ВГС за счёт их взаимодействия с рекомбинантными антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок планшета. Образование комплекса «антиген-антитело» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата.

Один набор рассчитан на 24 анализа, включая контроли. Предусмотрено использование набора частями, в зависимости от количества проб (*от 2 анализируемых образцов до 22*). Комплектуется всеми необходимыми реагентами, кроме дистиллированной воды.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления иммуноглобулинов классов G и M к индивидуальному белкам вируса гепатита С в сыворотке (*плазме*) крови, а также подтверждения положительных результатов ИФА, полученных при скрининге.

2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВГС – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+ , прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 1 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^- , прозрачная жидкость жёлтого цвета) – 1 фл., 1 мл;
- конъюгат (антитела к IgM и IgG человека, меченные пероксидазой хрена) – 1 фл., 2 фл. или 3 фл.;
- раствор для разведения сывороток (РС, жидкость красного цвета) – 1 фл., 10 мл;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – 1 фл. или 2 фл., по 3 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК, жидкость зелёного цвета) – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл;
- плёнка для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток – 16 шт.

3. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

При работе с исследуемыми сыворотками и коПри 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.

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

- Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5%.
- Желательно использовать свежееотобранные образцы сыворотки (*плазмы*) крови. Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°С не более 5 суток, либо при минус (20±3)°С, если необходимо более длительное хранение.
- Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15 мин при 3000 об./мин.

- Нельзя использовать проросшие, гемолизованные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.
- Перед постановкой реакции все компоненты тест-системы необходимо выдержать не менее 30 мин при комнатной температуре (18-25)°С.
- Лиофилизированные компоненты должны быть восстановлены, как минимум, за 15 минут до их использования.
- 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 (2-8)°С.
- Растворы ТМБ и конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.
- При промывке лунки (*стрипа, планшета*) заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через края лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.
- При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за со-

стоянием ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно ёмкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

- Не допускать высыхания лунок стрипов 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, концентрат ТМБ, стоп-реагент*), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».
- Запрещается повторное использование планшета для предварительного нанесения сывороток.
- При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.
- Посуду (*ванночки*), используемые для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.
- В случае повторного использования посуду (*ванночки*) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (*ванночки*) для

раствора ТМБ сразу после работы промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

- Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих 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.
- Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать во время проведения ИФА перекись водорода, хлорамин и т.д.

3.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

3.1.1. Промывочный раствор

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

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см. таблицу, стр. 11) и развести его дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до **700 мл**.

Хранение: при (2-8)°С до 72 ч.

3.1.2. Раствор конъюгата

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

Приготовить **концентрированный раствор конъюгата** путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в **1 мл РПР**.

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

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).

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	Промывочный раствор											
ФСБ-Т×25, мл	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	
Дистиллированная вода, мл	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600	
	Раствор конъюгата в рабочем разведении											
Конъюгат (концентрат), мкл	2×α	3×α	4×α	5×α	6×α	7×α	8×α	9×α	10×α	11×α	12×α	
РК, мл	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0	
	Раствор ТМБ в рабочем разведении											
ТМБ (концентрат) мкл	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600	
СВР, мл	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0	

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрированного раствора конъюгата (см. таблицу), добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

Конъюгат в рабочем разведении хранению не подлежит.

3.1.3. Раствор ТМБ в рабочем разведении

Внимание! Раствор ТМБ готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрата ТМБ (см. таблицу), добавить к нему соответствующее количество СБР, тщательно перемешать.

Раствор стабилен до 3-х ч в защищённом от света месте при (18-25)°С.

3.2. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Набор рассчитан на **24 анализа**, включая контроли. Предусмотрено использование набора частями, в зависимости от количества анализируемых проб:

Количество анализируемых проб	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22
Количество используемых стрипов	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

3.2.1. 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 застёжкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при (2-8)°С до 1 месяца.

Приготовить промывочный раствор (п. 3.1.1) и концентрированный раствор конъюгата (п. 3.1.2).

Перед постановкой ИФА лунки стрипов промыть 1 раз промывочным раствором.

Внимание! Каждую лунку при промывке 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 перевёрнутыми стрипами по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге. *Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями при постановке реакции.*

3.2.2. 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 следует вносить в 4 лунки вертикального ряда согласно схеме (стр. 15) для проведения реакции с каждым антигеном отдельно.

Во все лунки стрипов внести по **60 мкл РС**. В лунки, предназначенные для K^+ (см. схему), внести по **40 мкл раствора положительного контрольного образца**. В лунки, предназначенные для K^- , внести по **40 мкл раствора отрицательного контрольного образца**.

В лунки, предназначенные для анализа исследуемых образцов, внести по **40 мкл испытуемых сывороток**. Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным перемешиванием (*пипетирование не менее 4 раз*).

Схема постановки анализа

	core	NS3	NS4	NS5	core	NS3	NS4	NS5
1	Контроль K^-				Контроль K^+			
2	Сыворотка № 1				Сыворотка № 2			
3	Сыворотка № 3				Сыворотка № 4			
4	Сыворотка № 5				Сыворотка № 6			
5	Сыворотка № 7				Сыворотка № 8			
6	Сыворотка № 9				Сыворотка № 10			
7	Сыворотка № 11				Сыворотка № 12			
8	Сыворотка № 13				Сыворотка № 14			
9	Сыворотка № 15				Сыворотка № 16			
10	Сыворотка № 17				Сыворотка № 18			
11	Сыворотка № 19				Сыворотка № 20			
12	Сыворотка № 21				Сыворотка № 22			

Стрипы заклеить плёнкой и инкубировать в соответствии с выбранной процедурой:

процедура 1 — 37°C 30 мин, шейкер (500 об./мин);

процедура 2 — 37°C 1 час, термостат.

За 5 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (*п. 3.1.2*).

3.2.3. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промыточным раствором и удалить влагу, как описано выше (*п. 3.2.1*).

3.2.4. Во все лунки внести по **100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении**.

Внимание! Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Стрипы заклеить плёнкой, инкубировать 30 минут при 37°C.

3.2.5. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промыточным раствором и удалить влагу, как описано выше (*п. 3.2.1*).

3.2.6. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении (*п.3.1.3*).

Во все лунки внести по **100 мкл раствора ТМБ**.

Внимание! Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Стрипы инкубировать 30 мин при (18-25)°C или 20 мин при 37°C в условиях, защищённых от света.

3.2.7. Реакцию остановить добавлением во все лунки по **100 мкл стоп-реагента** и немедленно измерить оптическую плотность (ОП).

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

4. РЕГИСТРАЦИЯ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность 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.

Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- значения ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом (*ОП K⁻*) не более 0,2;
- значения ОП в лунках с положительным контрольным образцом (*ОП K⁺*) не менее 0,8.

Учёт результатов анализа сывороток проводить раздельно к каждому антигену ВГС. ОП критическую (*ОП_{крит.}*) рассчитать по формулам:

$$\text{ОП}_{\text{крит.}}(\text{core}) = \text{ОП } K^-(\text{core}) + 0,2;$$

$$\text{ОП}_{\text{крит.}}(\text{NS3}) = \text{ОП } K^-(\text{NS3}) + 0,2;$$

$$\text{ОП}_{\text{крит.}}(\text{NS4}) = \text{ОП } K^-(\text{NS4}) + 0,2;$$

$$\text{ОП}_{\text{крит.}}(\text{NS5}) = \text{ОП } K^-(\text{NS5}) + 0,2.$$

Для интерпретации результатов исследования сывороток использовать коэффициент позитивности (*КП*), который рассчитать для каждого антигена:

$$\text{КП}(\text{core}) = \text{ОП}_{\text{иссл. сыв.}}(\text{core}) / \text{ОП}_{\text{крит.}}(\text{core});$$

$$\text{КП}(\text{NS3}) = \text{ОП}_{\text{иссл. сыв.}}(\text{NS3}) / \text{ОП}_{\text{крит.}}(\text{NS3});$$

$$\text{КП}(\text{NS4}) = \text{ОП}_{\text{иссл. сыв.}}(\text{NS4}) / \text{ОП}_{\text{крит.}}(\text{NS4});$$

$$\text{КП}(\text{NS5}) = \text{ОП}_{\text{иссл. сыв.}}(\text{NS5}) / \text{ОП}_{\text{крит.}}(\text{NS5}).$$

Если КП для каждого антигена меньше 1, исследуемый образец расценивать как отрицательно реагирующий и не имеющий антител к структурным и неструктурным белкам, используемым в данном наборе.

Результаты анализа считать положительными, если значение $\text{КП} \geq 1$:

1) для *core* антигена;

или

2) для любых двух NS антигенов.

Результат расценивать как неопределённый, если только с одним из неструктурных белков получена положительная реакция ($\text{КП} \geq 1$).

Коэффициент позитивности – удобная и простая величина для наблюдения заболевания в динамике.

5. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Наборы хранить и транспортировать при температуре (2-8)°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток. Не допускать замораживания.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

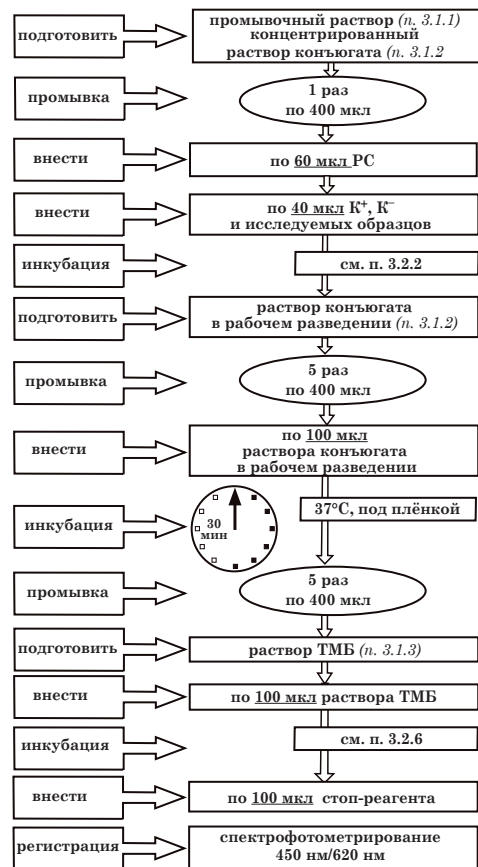
Рекламации на качество набора направлять:

в Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских препаратов (ГИСК) им. Л.А. Тарасевича по адресу:
119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41,
тел. (495) 241-39-22;

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

10.11.08

Схема анализа D-0774



**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 42/055/2001
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путём
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492

Тел.: (383) 332-37-58, 332-37-10, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

E-mail: vbmarket@online.nsk.su

Internet: www.vector-best.ru