

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного
выявления иммуноглобулинов
класса М к вирусу гепатита С

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**РекомбиБест анти-
ВГС – IgM**

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-0760

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

Основным свойством набора является способность выявлять в сыворотке (*плазме*) крови человека специфические иммуноглобулины класса М (*IgM*) к разным антигенам ВГС за счёт их взаимодействия с иммобилизованными на планшетах рекомбинантными антигенами этого вируса. Образование комплекса антиген-антитело выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата.

Один набор рассчитан на 96 анализов, включая контроли. Предусмотрено использование набора частями, в зависимости от количества проб (*от 3 анализируемых образцов до 91*). Возможны 12 независимых постановок ИФА.

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления IgM к антигенам ВГС в сыворотке (*плазме*) крови и может быть использован для диагностики первичной и рецидивирующей инфекции гепатита С, а также для определения эффективности лечения.

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 человека, меченные пероксидазой хрена) – 1 фл. или 2 фл.;
- раствор для разведения сывороток (РС, жидкость жёлто-красного цвета) – 1 фл., 16 мл;
- раствор для предварительного разведения (РПП) – 1 фл., 3 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – 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 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 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.
- Ванночки, используемые для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.
- В случае повторного использования ванночки для раствора конъюгата промыть дистиллированной водой; 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 во время проведения ИФА обрабатывать 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 прогреть 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)°C 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)°C 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**).

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, не посредственно перед использованием!

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

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество 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.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор												
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
Раствор конъюгата в рабочем разведении												
Конъюгат (концентрат), мкл	α^*	2× α	3× α	4× α	5× α	6× α	7× α	8× α	9× α	10× α	11× α	12× α
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
Раствор 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

$\alpha = \blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \text{ мкл}$

3.2. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

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

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. Во все лунки стрипов внести по **80 мкл РС**, в любые 2 лунки внести по **20 мкл** раствора K^- , в 2 другие – по **20 мкл** K^+ , одну лунку оставить с РС – контроль конъюгата.

Во все остальные лунки внести по **20 мкл испытуемых сывороток**, получая, таким образом, конечное разведение сывороток 1:5. *Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипетирование не менее 4 раз).*

Лунки заклеить плёнкой и инкубировать 30 мин при 37°С.

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 промывочным 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.

Лунки заклеить плёнкой и инкубировать 30 мин при 37°С.

3.2.5. По окончании инкубации содержи-

мое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором и удалить влагу, как описано выше.

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

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

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

Стрипы поместить на 30 мин в защищённое от света место при (18-25)°С.

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») осуществляют по воздуху.

Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– значение ОП в лунке с контролем конъюгата и среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОП_{ср} К⁻) не более 0,2;

– среднее значение ОП в лунках с положительным контрольным образцом (ОП_{ср} К⁺) превышает (ОП_{ср} К⁻) более чем на 0,4.

По результатам ИФА рассчитать значение ОП критическую (ОП_{крит}) по формуле:

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

Для интерпретации результатов использовать коэффициент позитивности (КП):

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

Если КП < 1, результат оценивать **как отрицательный**.

Если $KП \geq 1$, исследуемую сыворотку расценивать **как положительно** реагирующую.

При обнаружении положительно реагирующей сыворотки этот образец исследовать повторно для воспроизведения положительного результата или исключения технической ошибки.

Если положительный результат воспроизводится, рекомендуется наблюдение в динамике (*через 2-3 мес.*) с параллельным исследованием на антитела класса IgG.

5. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

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

Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

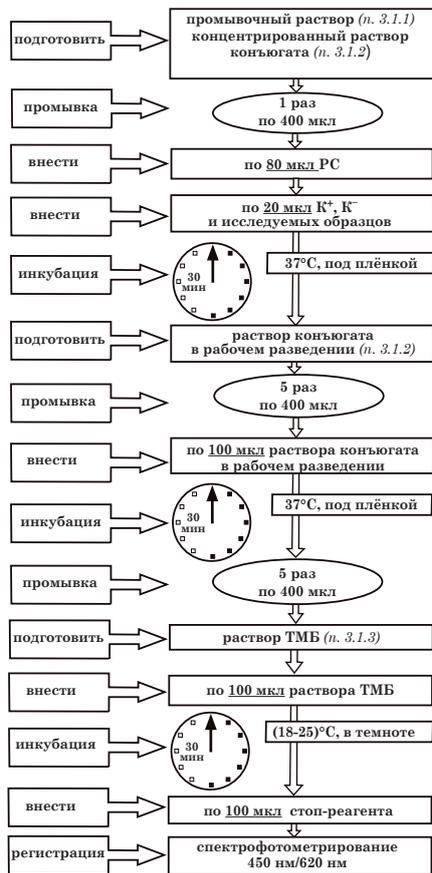
Рекламации на качество набора направлять:

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*

07.04.09

Схема анализа D-0760



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

Федеральная лицензия № 99-04-000086
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