

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Генеральний директор
ТОВ «Бест Діагностик»
_____ О.В. Шкурдай
«__» _____ 2012 р.

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для імуноферментного виявлення імуноглобулінів
класів G і M до вірусу гепатиту С
«ВГС-антитіла-БЕСТ»

«ВГС-антитіла-БЕСТ» являє собою набір реагентів, основою якого є рекомбінантні антигени ВГС, що відповідають ділянкам білків, кодованих структурною (core) і неструктурною (NS3, NS4, NS5) областю генома ВГС, іммобілізовані на поверхні лунок полістиролових планшетів.

Один набір розрахований на проведення: (комплект 1) - 96 аналізів, (комплект 2) - 192 аналізи, (комплект 3) – 480 аналізів включаючи контролю. Всі набори стрипової комплектації.

Набір адаптований для постановки ІФА на імуноферментних аналізаторах відкритого типу («TECAN SUNRISE», виробник «TECAN», «PR-2100», виробник «BIO-RAD», «MULTISCAN», виробник «Labsystems».).

Призначення

Набір реагентів призначений для виявлення імуноглобулінів класів G і M до вірусу гепатиту С в сироватці (плазмі) крові людини. Рекомендується для обстеження донорів крові, органів, тканин людини і диференціальної діагностики вірусних гепатитів.

Аналітичні характеристики

Специфічність становить - 100%.

Чутливість становить - 100% .

СКЛАД НАБОРУ (з розрахунку на 1 планшет)

- планшет з іммобілізованими рекомбінантними антигенами ВГС (core, NS3, NS4 та NS5) - шт.
- позитивний контрольний зразок, інактивованний, (К+, рідина рожевого кольору або прозора рідина червоного кольору) - 1 фл.
- негативний контрольний зразок, інактивованний (К-, рідина жовтого кольору) - 1 фл.
- кон'югат, розчин (ПК, антитіла до IgM і IgG людини, мічені пероксидазою хрому) - 1 фл.;
- розчин для розведення сироваток (PPC, рідина коричнево-зеленого кольору або рідина червоного кольору) - 1 фл.;
- розчин для промивання, концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з тритоном або з твіном (ФСБ× 20 або ФСБ-Тх25) - 1 фл.;
- розчин ТМБ, (тетраметілбензідін) - 1 фл.;
- стоп-реагент - 1 фл.;

Набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів, бланком для внесення проб.

Матеріали та обладнання

Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5-3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

Запобіжні заходи

При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не піпетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

Підготовка зразків

Зразки до дослідження можна зберігати не більше 7 діб при температурі від 2 до 8 С і 3 міс при температурі мінус 20 С або нижчою. Допускається тільки одноразове заморожування-розморожування зразків. Розморожені зразки

перед дослідженням ретельно перемішати.

Не допускається використання для дослідження зразків з підвищеним вмістом ліпідів і (або) з ознаками гемолізу, і (або) з видимим мікробним проростанням.

Зразки, що містять осад, перед аналізом відцентрифугувати протягом 10-15 хв при 2500-3000 об / хв.

Підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «ВГС-антитіла-БЕСТ» при кімнатній температурі 18-25 °С протягом 30 хвилин перед використанням.

Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та зберігайте щільно закритим на замок при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

Розчин для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

Процедура аналізу

- підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета.
- заповнити бланк внесення проб.
- приготувати розчин для промивання .
- внести в усі лунки планшета по 80 мкл розчину для розведення сироваток.
- внести в лунки по 40 мкл контролів та досліджуваних зразків: в одну лунку – позитивний контроль, в три інші лунки – негативний контроль. В решту лунок – досліджувані зразки. Під час внесення сироваток та контролів обережно піпетуйте суміш – відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з коричнево-зеленого на блакитний.

- заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 60 хвилин при температурі 37°C.

Процедура промивки

По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;
- видалити розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після видалення на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої видалення позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

- в лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37 °С.

- по закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті «процедура промивки»

- «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником, обережно відбирати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, вносити по 100 мкл розчину ТМБ в лунки

- інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25 °С.

- для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

- виміряти на рідері оптичну густина в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

Облік результатів та їх інтерпретація

Достовірність результатів аналізу:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$ОГ K_{-середнє} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3}) / 3.$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

- оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 1,5 оптичних одиниць (ОО),
- ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,1 ОО.
- оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$ОГ K_{-середнє} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{-середнє} \times 2,0.$$

Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення K- за рештою значень негативного контролю.

Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,20, тобто

$$Граничне значення = ОГ K_{-середнє} + 0,20.$$

Розрахувати «сіру зону» значень ОГ, що знаходиться до 10 % нижче від граничного значення тест-системи «ВГС-антитіла-БЕСТ», тобто

$$0,9xГЗ \leq Сіра зона \leq ГЗ$$

Інтерпретація результатів

Зразки із значенням оптичної густини нижче «сірої зони» значень ОГ вважаються **негативними** в тест-системі «ВГС-антитіла-БЕСТ».

Досліджувані зразки в межах «сірої зони» значень ОГ вважати **невизначеними**. Такі сироватки слід дослідити повторно в двох лунках тест-системи.

Зразки із значенням ОГ вище граничного значення вважаються первинно позитивними. Такі зразки мають бути досліджені повторно в двох лунках тест-системи «ВГС-антитіла-БЕСТ». Після повторного тестування **позитивними** в тест-системі «ВГС-антитіла-БЕСТ» вважаються зразки, ОГ котрих хоча б в одному з повторів була вище або дорівнювала граничному значенню. Якщо при повторному тестуванні ОГ зразка в обох повторах була нижче граничного значення таку сироватку вважати негативною.

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ НАБОРУ

Набір реагентів «ВГС-антитіла-БЕСТ» слід зберігати і транспортувати в упаковці підприємства-виробника при температурі (2-8) ° С протягом усього терміну придатності (14 місяців). Допускається транспортування набору при температурі до 25 ° С не більше 10 діб.

Заморожування набору не допускається.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися в ТОВ «Бест Діагностик» за адресою:

04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9,

тел./факс: (044) 500-57-11

e-mail: info@bestdiagnostic.com.ua

Виробник залишає за собою право вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.

КОРОТКА СХЕМА ПОСТАНОВКИ «ВГС-антитіла-БЕСТ»

<i>Використовувати тільки після ретельного ознайомлення з інструкцією!</i>		
Витримати	реагенти 30 хв. при 18-25°C	
Приготувати	розчин для промивання планшету, розвести 20х концентрат розчину для промивання <i>Tr100</i> очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води	
Заповнити	бланк внесення проб для аналізу	
Внести	в лунки планшету по 80 мкл розчину для розведення сироваток	
Внести	по 40 мкл досліджуваних зразків та контролів в лунки: A1 – позитивний контроль, B1, C1, D1 – негативний контроль, E1 та решта лунок – досліджувані зразки <i>Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з коричнево-зеленого на синій</i>	
Інкубація	Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 60 хв. при 37°C	
Промити	Лунки 5 разів	
Внести	В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату (зелений)	
Інкубація	планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі 37°C	
Промити	Лунки 5 разів	
Внести	В лунки стрипів внести по 100 мкл ТМБ-субстрату	
Інкубація	планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі 18-25 °C	
Внести	В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту	
Виміряти	оптичну густина в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм	
Розрахувати	Розрахувати граничне значення (ГЗ) в тест-системі «ВГС-антитіла-БЕСТ» за формулою $GZ = OG_{\text{середнє}} + 0,20$	
Провести облік результатів	Значення оптичної густини $> GZ$ $0,9 \times GZ \leq OG \leq GZ$ $< 0,9 \times GZ$	Результат позитивний невизначений негативний