

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

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

«ВГС-підтверджуючий-БЕСТ» являє собою набір реагентів, основою якого є рекомбінантні антигени ВГС, відповідні ділянок білків, кодованих структурної (*core*) і неструктурної (*NS3, NS4, NS5*) областю генома ВГС, іммобілізовані роздільно на поверхні лунок розбірного полістироловий планшет.

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів призначений для виявлення імуноглобулінів класів G і M до структурних і неструктурних білків вірусу гепатиту С в сироватці (плазмі) крові з метою підтвердження позитивних результатів ІФА, отриманих при скринінгу. Один набір розрахований на 48 аналізів, включаючи контролю.

2. СКЛАД НАБОРУ

- планшет розбірний з іммобілізованими рекомбінантними антигенами ВГС - 1 шт.
- позитивний контрольний зразок, інактивований (К+, прозора рідина червоного кольору) - 1 фл.
- негативний контрольний зразок, інактивований (К-, прозора рідина жовтого кольору) - 1 фл.
- кон'югат (антитіла до IgM і IgG людини, мічені пероксидазою хрому) - 1 фл.
- розчин для розведення сироваток (РС, рідина червоного кольору) - 1 фл.;
- розчин для попереднього розведення (РПР) - 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату (РК, рідина зеленого кольору) - 1 фл.;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твін (ФСБ-Т × 25) - 1 фл.;
- субстратний буферний розчин (СБР) - 1 фл.;
- тетраметілбензідін (ТМБ), концентрат - 1 фл.;
- стоп-реагент - 1 фл.;

3. 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.

3.1. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

3.1.1. Розчин для промивання

Збовтати вміст флакона з ФСБ-Т × 25. При випаданні в концентраті осаду солей прогріти його до повного розчинення осаду.

Відповідно до числом використовуваних стрипів відібрати необхідну кількість ФСБ-Т × 25 (див. таблицю) і розвести його дистильованою водою до зазначеного в таблиці об'єму або вміст 1 флакона - до 700 мл.

Зберігання: при (2-8) °С до 5 діб.

3.1.2. Розчин кон'югату

Увага! Для роботи з кон'югатом рекомендуємо використовувати одноразові наконечники для піпеток.

Приготувати концентрований розчин кон'югату шляхом розчинення містимого флакона з кон'югатом в 1 мл РПР.

Зберігання: концентрований розчин кон'югату - при (2-8) °С до 1 місяця.

Увага! Розчин кон'югату в робочому розведенні готувати в пластиковій ванночці, безпосередньо перед використанням!

Ретельно збовтати вміст флакона з розчином для розведення кон'югату (РК).

У пластикову ванночку відібрати необхідну кількість концентрованого розчину кон'югату (див. таблицю), додати відповідну кількість РК, ретельно перемішати піпетування.

Кон'югат в робочому розведенні зберігання не підлягає.

3.1.3. Розчин ТМБ в робочому розведенні

Увага! Розчин ТМБ готувати в пластиковій ванночці, безпосередньо перед використанням! Рекомендуємо виділити наконечники для піпеток, які використовувати тільки для роботи з ТМБ.

У пластикову ванночку відібрати необхідну кількість концентрату ТМБ (див.таблицю), додати до нього відповідну кількість СБР, ретельно перемішати.

Розчин стабільний до 3-х годин у захищеному від світла місці при (18-25) ° С.

Таблиця витрати реагентів

	Кількість використаних стрипів											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промиваючий розчин												
ФСБ-Т□25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистильована 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
Розчин кон'югату в робочому розведенні												
Кон'югат (Концентрат), мкл	a*	2xa	3xa	4xa	5xa	6xa	7xa	8xa	9xa	10xa	11xa	12xa
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
Розчин ТМБ в робочому розведенні												
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

a=80 мкл

3.2. ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Набір розрахований на **48 аналізів**, включаючи контролю. Передбачено використання набору частинами, залежно від кількості аналізованих проб:

Кількість аналізуємих проб	1	2-5	6-9	10-13	14-17	18-21	22-25	26-29	30-33	34-37	38-41	42-45
Кількість використовуваних стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

3.2.1. Підготувати необхідну кількість стрипів до роботи. Решта - відразу упакувати щоб уникнути згубного впливу вологи. Для цього стрипи помістити в цефленовий пакет з вологопоглиначем, ретельно закрити пакет пластиковою застібкою. Упаковані таким чином стрипи зберігати при (2-8) ° С до закінчення терміну придатності.

Приготувати розчин для промивання (п. 3.1.1) і концентрований розчин кон'югату (п. 3.1.2).

Перед постановкою ІФА лунки стрипів промити 1 раз розчином для промивання.

Увага! Кожну лунку при промиванні необхідно заповнювати повністю (400 мкл розчину для промивання). Необхідно щоб було повне спорознення лунок після кожного їх заповнення. Час між заповненням і спорозненням лунок повинно бути не менше 30 сек.

Після закінчення промивання необхідно ретельно видалити вологу з лунок, постукуючи перевернутими стріпах по складеному в декілька шарів фільтрувальному папері. **Не допускати висихання лунок стрипів між окремими операціями при постановці реакції.**

3.2.2.В лунках стрипів на рядках А, С, Е, G іммобілізован антиген, який кодується структурною (core) областю генома, а на рядках В, D, F, H іммобілізовані антигени, які відповідають неструктурній області геному ВГС (NS3, NS4, NS5).Тому всі контролю і досліджувані сироватки вносять у дві лунки вертикального ряду для проведення реакції з кожним антигеном окремо згідно зі схемою .

У всі лунки стрипів внести по 60 мкл РС. У лунки, призначені для К + , внести по 40 мкл розчину контрольного позитивного зразка К + . У лунки, призначені для К-, внести по 40 мкл розчину контрольного негативного зразка К-.

У лунки, призначені для аналізу досліджуваних зразків, внести по 40 мкл досліджуваних сироваток. Внесення сироваток має супроводжуватися ретельним перемішуванням (піпетування не менше 4 разів).

Лунки заклеїти плівкою і інкубувати відповідно до обраної процедури:

процедура 1 - 37 ° С 30 хв, шейкер (500 об. / хв);

процедура 2 - 37 ° С 1 годину, термостат.

За 5 хвилин до закінчення інкубації приготувати розчин кон'югату в робочому розведенні (п. 3.1.2).

3.2.3. Після закінчення інкубації вміст лунок зібрати в посудину з дезінфікуючим розчином, промити лунки

стрипів 5 разів розчином для промивання і видалити вологу, як описано вище (п. 3.2.1).

3.2.4. У всі лунки внести по 100 мкл розчину кон'югату в робочому розведенні.

Увага! Для внесення розчину кон'югату використовувати пластикову ванночку і одноразові наконечники, що входять до складу набору.

Лунки заклеїти плівкою, інкубувати 30 хв при 37 ° С.

3.2.5. Після закінчення інкубації вміст лунок зібрати в посудину з дезінфікуючим розчином, промити лунки 5 разів розчином для промивання і видалити вологу, як описано вище.

3.2.6. Приготувати розчин ТМБ в робочому розведенні (п. 3.1.3).

У всі лунки внести по 100 мкл розчину ТМБ.

Увага! Для внесення розчину ТМБ використовувати пластикову ванночку і одноразові наконечники, що входять до складу набору.

Планшет інкубувати 20 хв при (18-25) ° С або 15 хв при 37 ° С в умовах, захищених від світла.

3.2.7. Реакцію зупинити додаванням до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту і негайно виміряти оптичну щільність (ОГ).

Увага! Слід уникати попадання стоп-реагенту на одяг і відкриті ділянки тіла. При попаданні - промити великою кількістю води.

4. РЕЄСТРАЦІЯ ТА ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати ІФА реєструвати за допомогою спектрофотометра, вимірюючи оптичну щільність у двохвильовому режимі: основний фільтр - 450 нм, референс-фільтр - в діапазоні 620-650 нм. Допустима реєстрація результатів тільки з фільтром 450 нм. Виведення спектрофотометра на нульовий рівень («бланк») здійснювати по повітрю.

Результати досліджень враховувати тільки при дотриманні наступних умов:

- Середнє значення ОГ в лунках з негативним контрольним зразком (ОГсер К-) не більше 0,2;
- Значення ОГ в лунках з позитивним контрольним зразком (ОГ К+) не менше 0,8.

За результатами ІФА для кожного антигену розрахувати своє значення критичної оптичної щільності (ОГкрит) за формулами:

$$\text{ОГкрит (core)} = \text{ОГсер (К-) core} + 0,2$$

$$\text{ОГкрит (NS)} = \text{ОГсер (К-) NS} + 0,2$$

Для інтерпретації результатів дослідження сироваток використовувати коефіцієнт позитивності (КП), який розрахувати для кожного антигену за формулами:

$$\text{КП (core)} = \text{ОГдосл. сив. (core)} / \text{ОГкрит. (core)},$$

$$\text{КП (NS)} = \text{ОГдосл. сив. (NS)} / \text{ОГкрит. (NS)}.$$

Якщо КП для кожного антигену менше 1, досліджуваний зразок розцінювати як негативно реагує і не має антитіл до структурних та неструктурних білків, які у даному наборі.

Якщо $\text{КП} \geq 1$ хоча б для одного антигену, досліджуваний зразок розцінювати як позитивно реагує в даному наборі.

Коефіцієнт позитивності - зручна і проста величина для спостереження захворювання в динаміці.

5. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ НАБОРУ

Набір реагентів «ВГС-підтверджуючий-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.