

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів

для імуноферментного виявлення антитіл до вірусу гепатиту С і core антигену ВГС
«ВГС-АГ/АТ-БЕСТ»

«ВГС-АГ/АТ-БЕСТ» являє собою набір реагентів, основою якого є рекомбінантні антигени вірусу гепатиту С (ВГС), відповідні ділянок білків, кодованих структурної (core) і неструктурної (NS3, NS4, NS5) областю геному ВГС, і антитіла до капсидного білка (core антигену) ВГС, іммобілізовані на поверхні лунок розбірного полістиролового планшета.

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 аналітичних аналізаторах відкритого типу («TECAN SUNRISE», виробник «TECAN», «PR-2100», виробник «BIO-RAD», «MULTISCAN», виробник «Labsystems»,).

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів призначений для одночасного виявлення core антигену ВГС і імуноглобулінів класів G і M до білків вірусу гепатиту С (core, NS3, NS4, NS5) в сироватці (плазмі) крові. Рекомендується для лабораторної діагностики гепатиту С і обстеження донорів крові.

2. СКЛАД НАБОРУ (з розрахунку на 1 планшет)

- планшет розбірний з іммобілізованими рекомбінантними антигенами ВГС і моноклональними антитілами до core антигену ВГС – 1 шт.
- позитивний контрольний зразок № 1 (K1 +), що містить антитіла до антигенів ВГС, інактивований, прозора рідина червоного кольору - 1 фл.;
- позитивний контрольний зразок № 2 (K2 +), що містить рекомбінантний core антиген ВГС, ліофілізований, аморфна маса жовтого кольору – 1 фл.; або прозора рідина жовтого кольору - 1 фл.;
- негативний контрольний зразок (K-), інактивований, прозора рідина жовтого кольору - 1 фл.;
- кон'югат № 1 (моноклональні антитіла до core антигену ВГС), ліофілізований - 1 фл.;
- кон'югат № 2 (антитіла до IgM і IgG людини), ліофілізований - 1 фл.;
- розчин для попереднього розведення (РПР) - 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату № 1 (PK1), прозора рідина синього кольору - 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату № 2 (PK2), прозора рідина жовтого кольору - 1 фл.;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твін (ФСБ-Т × 25) - 1 фл.;
- тетраметілбензідін (ТМБ), концентрат - 1 фл.;
- субстратний буферний розчин (СБР) - 1 фл.;
- стоп-реагент - 1 фл.,.

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

3. СПОСІБ ЗАСТОСУВАННЯ

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.

Перед постановкою реакції всі компоненти набору необхідно витримати при кімнатній температурі (18-25) ° С не менше 30 хв. Ліофілізовані компоненти повинні бути відновлені, як мінімум, за 15 хвилин до їх використання.

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 1, стор 10) 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.

Таблиця 1 Таблиця витрати реагентів набору при ручному постановці ІФА

	Кількість використаних стрипів											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промивний розчин												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	флакон
Дистильована вода	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 700
Розчин кон'югату № 1 в робочому розведенні												
Концентрована ний розчин кон'югату № 1, мкл	α^*	$2 \times \alpha$	$3 \times \alpha$	$4 \times \alpha$	$5 \times \alpha$	$6 \times \alpha$	$7 \times \alpha$	$8 \times \alpha$	$9 \times \alpha$	$10 \times \alpha$	$11 \times \alpha$	$21 \times \alpha$
РК1, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	флакон
Розчин кон'югату № 2 в робочому розведенні												
Концентрована ний розчин кон'югату № 2, мкл	$1,5 \times \beta^*$	$3 \times \beta$	$4,5 \times \beta$	$6 \times \beta$	$7,5 \times \beta$	$9 \times \beta$	$10,5 \times \beta$	$12 \times \beta$	$13,5 \times \beta$	$15 \times \beta$	$16,5 \times \beta$	$26 \times \beta$
РК2, мл	1,5	3	4,5	6	7,5	9	10,5	12	13,5	15	16,5	флакон
Розчин ТМБ в робочому розведенні												
ТМБ (концентрат), мкл	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	1050
СБР, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	флакон

Таблиця 2 Таблиця витрати реагентів при постановці на автоматичних ІФА-аналізаторах відкритого типу **

	Кількість використаних стрипів											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Розчин кон'югату № 1 в робочому розведенні												
Концентрований розчин кон'югату № 1, мкл	$2,5 \times \alpha^*$	$3,5 \times \alpha$	$4 \times \alpha$	$5 \times \alpha$	$6 \times \alpha$	$7 \times \alpha$	$8 \times \alpha$	$8 \times \alpha$	$9 \times \alpha$	$10 \times \alpha$	$11 \times \alpha$	$21 \times \alpha$
РК1, мл	2,5	3,5	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	8,0	9,0	10,0	11,0	флакон
Розчин кон'югату № 2 в робочому розведенні												
Концентрований розчин кон'югату № 2, мкл	$3 \times \beta^*$	$4 \times \beta$	$6 \times \beta$	$7 \times \beta$	$8 \times \beta$	$9 \times \beta$	$10 \times \beta$	$12 \times \beta$	$13 \times \beta$	$14 \times \beta$	$15 \times \beta$	$26 \times \beta$
РК2, мл	3,0	4,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	12,0	13,0	14,0	15,0	флакон
Розчин ТМБ в робочому розведенні												
ТМБ (концентрат), мкл	125	175	200	250	300	350	400	400	450	500	550	1050
СБР, мл	2,5	3,5	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	8,0	9,0	10,0	11,0	флакон

** - Кількість реагентів розраховане на 6 незалежних постановок при проведенні аналізу на автоматичному ІФА-аналізаторі
 $\alpha^* = 40$ мкл, $\beta^* = 30$ мкл.

3.1.2. Контрольні зразки

Розчинити ліофілізований контрольний зразок К2 +, додавши до флакона 1,0 мл РІР. Ретельно перемішати.

Зберігання: при (2-8) °С до 1 місяця.

Рідкі контрольні зразки К1 +, К2 + (при використанні рідкого зразка) і К-готові до використання.

3.1.3. Розчини кон'югатів

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

Приготувати концентровані розчини кон'югатів шляхом розчинення вмісту кожного флакона з кон'югати № 1 і № 2 в 1 мл РГР.

Зберігання: концентровані розчини кон'югатів - при (2-8) ° С до 1 місяця.

Увага! Розчини кон'югатів № 1 і № 2 в робочих розведеннях готувати безпосередньо перед використанням (при проведенні постановки вручну) або перед завантаженням реагентів на борт аналізатора (при постановці на автоматичних ІФА-аналізаторах відкритого типу).

Ретельно збовтати вміст флаконів з РК1 і з РК2.

При ручній постановці аналізу в пластикову ванночку, прикладену до набору, відібрати необхідну кількість концентрованого розчину кон'югату № 1 (див. таблицю 1), додати відповідну кількість РК1, акуратно перемішати піпетування, уникаючи спінювання розчину.

В іншу пластикову ванночку відібрати необхідну кількість концентрованого розчину кон'югату № 2 (див. таблицю 1), додати відповідну кількість РК2, ретельно перемішати піпетування.

При постановці на автоматичному аналізаторі ІФА відібрати в ємність (або додатковий флакон) необхідне (відповідно до числа використовуваних стрипів) кількість РК1 (див. таблицю 2), додати зазначений обсяг концентрованого розчину кон'югату № 1, ретельно перемішати.

У додатковий флакон відібрати необхідне (відповідно до числа використовуваних стрипів) кількість РК2 (див. таблицю 2) додати концентрований розчин кон'югату № 2, ретельно перемішати.

Зберігання: розчини кон'югатів в робочому розведенні - при (18-25) ° С до 3 ч.

3.1.4. Розчин ТМБ в робочому розведенні

Увага! Розчин ТМБ в робочому розведенні готувати в пластиковій ванночці, що додається до набору, безпосередньо перед використанням (при проведенні постановки вручну) або в додатковій флаконі перед завантаженням реагентів на борт аналізатора (при дробовій постановці на автоматичних ІФА аналізаторах відкритого типу).

Рекомендуємо виділити наконечники для піпеток, які використовувати тільки для роботи з тетраметілбензидіном.

Відповідно до використовуваним кількістю стрипів необхідний обсяг концентрату ТМБ розвести відповідним обсягом СБР (див. таблицю 1 і 2), ретельно перемішати.

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

3.2. ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

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 1 місяця.

Приготувати розчин для промивання (п. 3.1.1), контрольний зразок К2 + (п. 3.1.2), концентровані розчини кон'югатів (п.3.1.3).

Увага! Промивний розчин, контрольний зразок К2 + і концентровані розчини кон'югатів повинні бути приготовлені, як мінімум, за 15 хв до постановки ІФА.

3.2.2. Приготувати розчин кон'югату № 1 в робочому розведенні (п. 3.1.3).

3.2.3. Перед використанням лунки стрипів промити 1 раз розчином для промивання, вносячи в кожен лунку не менше 400 мкл розчину. Після закінчення промивання необхідно ретельно видалити вологу з лунок, постукуючи перевернутими стрипами по складеній в декілька шарів фільтрувального паперу.

3.2.4. У всі лунки внести по 100 мкл розчину кон'югату № 1 в робочому розведенні.

Потім в 1 лунку планшета внести 50 мкл К1 +, в 1 лунку - 50 мкл К2 +, в 2 лунки - по 50 мкл К-, в інші лунки - по 50 мкл цілісних досліджуваних сироваток. Внесення сироваток супроводжувати ретельним перемішуванням (піпетування не менше 3 разів), уникаючи спінювання.

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

Примітка! При змішуванні розчину кон'югату № 1 в робочому розведенні з досліджуваним зразком (контролями) відбувається зміна кольору розчину в лунці планшету. Ступінь зміни кольору у різних зразків може відрізнятися.

При постановці ІФА на автоматичних ІФА-аналізаторах контроль внесення зразків в лунки з робочим розведенням кон'югату № 1 можна проводити за допомогою спектрофотометра, вимірюючи оптичну щільність при довжині хвилі 620 нм. Оптична щільність у кожній з лунок, що містять кон'югат № 1 і зразок, повинна бути більше 0,500 о.е.

Планшет інкубувати на шейкері при (37 ± 1) ° С 90 хв і при струшуванні 600 об / хв (при «ручний» постановці - лунки планшета заклеїти плівкою).

При постановці вручну за 5-10 хв до закінчення інкубації приготувати розчин кон'югату № 2 в робочому розведенні (п.3.1.3).

3.2.5. Після закінчення інкубації вміст лунок зібрати в посудину з дезінфікуючим розчином, промити лунки стрипів 5

разів отмивочним розчином.

Увага! Кожну лунку при промиванні необхідно заповнювати повністю (450 мкл робочого розчину для промивання в режимі «overflow» - надлишкової промивання). Необхідно добиватися повного спорожнення лунок після кожного їх заповнення. Час між заповненням і спорожненням лунок повинно бути не менше 30 сек.

Після закінчення промивання необхідно використовувати перехресну аспірацію розчину з лунок (режим «cross aspiration»). Якщо залишковий обсяг промивання в лунках перевищує 10 мкл, то необхідно ретельно видалити вологу з лунок, постукуючи перевернутим планшетом по складеній в декілька шарів фільтрувального паперу.

Не допускати висихання лунок планшетів між окремими операціями при постановці реакції.

3.2.6. У всі лунки стрипу внести по 150 мкл розчину кон'югату № 2 в робочому розведенні.

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

Планшет інкубувати при $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$ 30 хв (при «ручний» постановці - лунки планшета заклеїти плівкою).

Примітка: При постановці ІФА на автоматичних ІФА-аналізаторах контроль внесення в лунки планшета розчину кон'югату № 2 в робочому розведенні можна проводити за допомогою спектрофотометра, вимірюючи оптичну щільність при довжині хвилі 450 нм. Оптична щільність у кожній з лунок, що містять кон'югат № 2 повинна бути більше 0,900 о.е.

3.2.7. Після закінчення інкубації вміст лунок зібрати в посудину з дезінфікуючим розчином, лунки промити 5 разів розчином для промивання, як описано вище (п. 3.2.5).

3.2.8. Приготувати розчин ТМБ в робочому розведенні (п. 3.1.4).

У всі лунки внести по 100 мкл розчину ТМБ в робочому розведенні.

Планшет інкубувати при $(18-25)^\circ \text{C}$ в захищеному від світла місці 25 хв.

3.2.9. Реакцію зупинити додаванням в усі лунки 100 мкл стоп-реагенту і через 2-3 хв виміряти оптичну щільність (ОП).

Увага! Слід уникати попадання стоп-реагенту (0,5 М H_2SO_4) 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 двоххвильовому 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 (ОГсрК-) не більше 0,2;
- Значення ОГ в лунках з позитивними контрольними зразками К1 і К2 ++ не менше 0,8.

За результатами ІФА розрахувати значення критичної оптичної щільності (ОГкрит) за формулою:

$$\text{ОГкрит} = \text{ОГсрК} + 0,3.$$

Для інтерпретації результатів дослідження сироваток використовувати коефіцієнт позитивності (КП):

$$\text{КП} = \text{ОГзр} / \text{ОГкрит}.$$

Якщо ОГ К-та досліджуваних зразків сироваток мають негативні значення, при розрахунках ОГкрит та аналізі результатів вважати їх рівними нулю.

Якщо $\text{КП} < 1$, результат оцінювати як негативний.

Якщо $\text{КП} \geq 1$, досліджувану сироватку розцінювати як позитивно реагує.

При виявленні позитивно реагує сироватки цей зразок досліджувати повторно в цьому ж наборі паралельно в двох лунках.

При повторному отриманні позитивного результату хоча б в одній лунці - зразок вважати позитивним.

При негативних результатах повторного дослідження зразок вважати негативним.

Всі позитивно реагують зразки досліджувати далі на наявність антигенів ВГС в підтверджуючому тесті, що володіє більшою чутливістю і специфічністю, або імуноблотинг. У разі необхідності використовувати метод ПЛР для визначення вірусної РНК або тест для визначення соге-антигену ВГС.

Рекомендуємо позитивні результати аналізу видавати у вигляді коефіцієнтів позитивності, що є зручним при спостереженні за перебігом захворювання в динаміці. При тривалому спостереженні пацієнта з метою отримання результатів, адекватно відображають зміну змісту маркера в крові, необхідно використовувати набори реагентів одного найменування (одного підприємства-виробника).

5. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набори зберігати і транспортувати при $(2-8)^\circ \text{C}$. Допускається транспортування при температурі до 25°C не більше 10 діб.

Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

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.