

Затверджено  
Заступник головного державного санітарного  
лікаря України  
21 квітня 2005 р.

## ІНСТРУКЦІЯ ПРО ВИКОРИСТАННЯ

### DIA-HCV-different

тест-система імуноферментна  
для визначення антитіл до окремих білків вірусу  
гепатиту С (NS3, NS4, NS5, core)

Набір ТЗ

T-2408C

#### ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для окремого виявлення антитіл класу IgG до корового (core) та неструктурних (NS3, NS4, NS5) антигенів вірусу гепатиту С в сироватці або плазмі крові людини методом імуноферментного аналізу.

Може бути використаний як підтверджуючий тест результатів скринінгових досліджень при імуноферментній діагностиці гепатиту С.

#### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Тест-система являє собою набір, що включає наступні компоненти: *імуносорбент* – полістироловий планшет, в лунках якого окремо сорбовані рекомбінантні білки NS3, NS4, NS5, core – аналоги антигенів вірусу гепатиту С (кожний антиген сорбований на трьох окремих стрипах); *концентрат кон'югату* – моноклональні антитіла до імуноглобулінів класу IgG людини, кон'юговані з пероксидазою хрому; *позитивний контроль* – очищені імуноглобуліни класу IgG людини, специфічні до вірусу гепатиту С; *негативний контроль* – сироватка крові людини, яка не містить антитіла до вірусу гепатиту С, а також поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) та антитіла до ВІЛ і *Treponema pallidum*; *концентрат розчину для промивання* – концентрат фосфатно-сольового буферу, містить детергент; *розчин для розведення сироваток та кон'югату* – фосфатно-сольові буфери, що містять детергент, казеїнову фракцію білків молока, блок-компоненти, барвник і консерванти; *субстратний буфер* – цитратно-фосфатний буфер, що містить перекис водню; *хромоген* – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) в розчині; *стоп-реагент* – розчин сірчаної кислоти.

Зовнішній вигляд компонентів: *імуносорбент* – планшет, що складається з 12 стрипів по 8 лунок з можливістю відокремлення кожної лунки; *концентрат кон'югату* – червона з незначною опалесценцією рідина; *позитивний та негативний контроль* – світложовті з незначною опалесценцією рідини; *концентрат розчину для промивання* – безбарвна опалесцююча рідина, допускається розшарування та випадіння кристалічного осаду, що розчинюється при нагріванні; *розчин для розведення сироваток* – фіолетова опалесцююча рідина; *розчин для розведення кон'югату* – червона опалесцююча рідина; *субстратний буфер, розчин ТМБ, стоп-реагент* – прозорі безбарвні рідини.

Тест-система розрахована на проведення 24 аналізів, включаючи контроль, з можливістю використання планшета постріпово або використання частини стрипу на 3 постановки імуноферментного аналізу (3×8) для виявлення антитіл для кожного з антигенів.

#### Принцип аналізу

Принцип аналізу DIA-HCV-different базується на методі твердофазного непрямого ІФА.

При внесенні в лунки зразків досліджуваних сироваток антитіла, специфічні до окремих білків вірусу гепатиту С, у випадку їх наявності зв'язуються з рекомбінантними антигенами на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Утворені комплекси виявляють за допомогою кон'югату. Після відмивання незв'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника. Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину суміші у лунках (при довжині хвилі 450 нм). Позитивні результати в певних лунках свідчать про наявність у зразку антитіл до відповідного антигену вірусу гепатиту С.

#### СКЛАД НАБОРУ

N	Назва компоненту	Кількість
1	Імуносорбент	1 планшет (12×8)
2	Концентрат кон'югату (51x)	1 ампл. × 0,3 мл
3	Позитивний контроль	1 ампл. × 0,3 мл
4	Негативний контроль	1 ампл. × 0,3 мл
5	Концентрат розчину для промивання (46x)	2 фл. × 25 мл
6	Розчин для розведення сироваток	1 фл. × 15 мл
7	Розчин для розведення кон'югату	1 фл. × 15 мл
8	Субстратний буфер	1 фл. × 8 мл
9	Розчин ТМБ	1 фл. × 8 мл
10	Стоп-реагент	1 фл. × 15 мл
11	Клейка плівка	3 шт.

#### СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ

##### Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- вода дистильована;
- перекис водню, 6 %;
- спирт етиловий, 70°;
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- піпетки одноканальні (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) та наконечники до них;
- піпетки 8-канальні (50-300 мкл) та наконечники до них;
- мірна склянка або циліндр (1000 мл);
- ванночки для реагентів;
- флакони для реактивів, 20 мл;
- сухоповітряний термостат;
- апарат для промивання планшетів (вошер);
- фотометр для вимірювання оптичної густини в планшетах;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливу забруднених рідин.

##### Необхідні застереження

Заходи безпеки при застосуванні набору:

- роботу проводити в спеціально обладнаному приміщенні;
- працювати в гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- всі стічні розчини обробляти 6 % розчином перекису водню при кімнатній температурі протягом 3 годин;
- всі тверді відходи збирати в спеціальний контейнер, автоклавувати протягом 1 години при температурі 120°C;
- інструменти, обладнання, а також робочі поверхні протирати 70° етиловим спиртом.

Правила роботи з тест-системою:

- не використовувати набір після закінчення терміну придатності, не змішувати компоненти наборів різних серій;
  - ретельно перемішувати реагенти при підготовці та проведеному аналізу;
  - використовувати вимитий та сполоснутий дистильованою водою посуд для приготування реагентів;
  - не допускати підсихання лунок на всіх етапах постановки ІФА;
  - перевіряти точність дозування, слідкувати за робочим станом піпеток та іншого обладнання;
  - уникати попадання прямих сонячних променів на робочу поверхню під час проведення аналізу.
- Вимоги до промивання планшету:
- неякісне промивання планшету призводить до одержання некоректних результатів;
  - для промивання планшета рекомендується використовувати автоматичний промивач - вошер; у випадку відсутності вошера чи його поганої роботи можна промивати лунки 8-канальною піпеткою;
  - на всіх етапах промивання необхідно контролювати заповнення лунок і повну аспірацію (видалення) рідини з них: лунки повинні заповнюватись повністю (350 мкл в лунку), без переповнення та перетікання рідини з сусідніх лунок.

##### Підготовка зразків

Зразки сироваток чи плазми крові зберігають при температурі 2-8°C не більше 72 годин. Допускається заморожування зразків (бажано до температури нижче -20°C) не більше двох разів. Необхідно освітлювати зразки сироваток (плазми), які містять агрегати та осад, за допомогою центрифугування.

Зразки з азидом натрію, гемолізом, гіперліпідемією або бактеріальним проростанням не придатні для аналізу.

## Проведення аналізу

### 1 Підготовка до аналізу (з розрахунку на 32 лунки)

Витримують компоненти набору при температурі 18-25°C протягом 30 хвилин.

#### 1.1 Приготування розчину для промивання

Вміст одного флакону концентрату розчину для промивання інтенсивно потрушують. Відбирають 12 мл розчину і розводять в 540 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогрівають перед використанням при 35-37°C до повного розчинення кристалів.

Розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 10 діб.

#### 1.2 Приготування розчину кон'югату

В чистий флакон відбирають 4 мл розчину для розведення кон'югату та додають 80 мкл концентрату кон'югату. Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

#### 1.3 Приготування розчину ТМБ субстрату

В чистий флакон відбирають 2 мл хромогену ТМБ і додають 2 мл субстратного буфера, суміш інтенсивно потрушують.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин ТМБ субстрату необхідно захищати від попадання прямого світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин ТМБ субстрату повинен бути безбарвним.

## 2 Проведення аналізу

Рекомбінантні поліпептиди - аналоги антигенів вірусу гепатиту С сорбовані в вертикальних рядах планшета наступним чином:

- coге - стрипи №№1, 5, 9 – позначені буквою «С».
- NS3 - стрипи №№2, 6, 10 – позначені цифрою «3».
- NS4 - стрипи №№3, 7, 11 – позначені цифрою «4».
- NS5 - стрипи №№4, 8, 12 – позначені цифрою «5».

• Готують розчин для промивання згідно п. 1.1.

• Звільняють необхідну кількість стрипів від упаковки, вставляють їх в рамку.

*Невикористані стрипи необхідно щільно закрити в пакеті та використати протягом одного місяця. Невикористані стрипи зберігають при температурі 2-8 °С.*

• Промивають лунки розчином для промивання (350 мкл розчину на лунку) один раз за допомогою промивача або 8-канальної піпетки, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

• В лунки вносять по 80 мкл розчину для розведення сироваток.

• В лунки А1, А2, А3, А4 вносять по 20 мкл позитивного контролю, а в лунки В1, В2, В3, В4 – по 20 мкл негативного контролю.

• В решту лунок стрипів вносять по 20 мкл зразків досліджуваних сироваток. Антигени coге, NS3, NS4, NS5 сорбовані на окремих стрипах. При проведенні аналізу кожний досліджуваний зразок вносять в чотири лунки з різними антигенами.

*Обережно піпетують суміш в лунках (під час піпетування відбувається зміна кольору розчину в лунках).*

• Накривають планшет клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °С протягом 60 хвилин.

• По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином для промивання, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

• Готують розчин кон'югату згідно п. 1.2.

• В лунки вносять по 100 мкл розчину кон'югату.

• Накривають планшет новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °С протягом 30 хвилин.

• По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки вісім разів розчином для промивання, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

• Готують розчин ТМБ субстрату згідно п. 1.3.

• Вносять в лунки по 100 мкл розчину ТМБ субстрату.

• Накривають планшет новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують його при температурі 18-25 °С в темному місці протягом 30 хвилин.

• Зупиняють кольорову реакцію внесенням до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту.

• Не більше як через 5 хвилин після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину (ОГ) у двохвильовому режимі (450 нм відносно 620 нм).

*ОГ можна визначати в однохвильовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки (бланк). Необхідно передбачити порожню лунку в планшеті при аналізі. При роботі в однохвильовому режимі знижується чутливість та точність аналізу.*

## ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

• Проведення аналізу вважають коректним, якщо значення оптичної густини в лунках з негативним контролем (ОГ К-) для кожного антигену не вище 0,1 оптичної одиниці (ОО), а значення ОГ позитивного контролю (ОГ К+) для кожного антигену не нижче 0,6 ОО.

• Граничне значення ОГ (ГЗ). ГЗ для кожного антигену розраховують окремо, додаючи константну величину **0,15** до значення ОГ К- відповідного антигену.

• Якщо ОГ зразка в лунці з певним антигеном перебільшує ГЗ, вважають, що зразок містить антитіла до відповідного антигену.

• Результати аналізу вважаються **негативними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка менше ГЗ для усіх досліджуваних антигенів.

• Результати аналізу вважаються **невизначеними**, якщо ОГ зразка більше ГЗ лише для одного досліджуваного антигену.

• Результати аналізу вважаються **позитивними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка більше ГЗ більш ніж для одного антигену.

## УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набір зберігають і транспортують при температурі 2-8°C.

Заморожувати набір не дозволяється.

## ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

Термін придатності набору – 1 рік.

## ФОРМА ВИПУСКУ – тест-набір.

Код АТС – V04CX.

## ПАКУВАННЯ

- Імуносорбент вкладений в пакет з багатошарової та комбінованої плівки; пакет термозапаяний.

- Кон'югат, позитивний контроль, негативний контроль розлиті в пластикові ампули об'ємом 0,5 мл або 2,0 мл.

- Розчини крім розчину ТМБ розлиті у пластмасові флакони об'ємом 30 мл або 35 мл.

- Розчин ТМБ розлитий у флакони з пластмаси коричневого кольору об'ємом 15 мл.

- Набір компонентів разом з інструкцією з використання поміщений в коробку з гофрокартону з пластмасовою вставкою.

## ВИРОБНИК

АТЗТ НВК „Діапроф-Мед“, 04123, Україна, м. Київ, вул. Світлицького, 35.

За довідками звертайтеся по тел./факсу (044) 433-75-82, 433-02-22 або e-mail: tech@diapr.kiev.ua.

**Рекламації** на якість наборів надсилайте до ДП “Центр імунобіологічних препаратів” за адресою: 03038, Україна, м. Київ, вул. М. Амосова, 5, тел. (044) 275-24-66, 275-07-02 та підприємству-виробнику.

У випадку порушення умов зберігання, транспортування та схеми постановки ІФА з вини споживача рекламації розглядаються як необґрунтовані.