

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для
выявления IgG-антител к вирусу гепатита С в
сыворотке или плазме крови человека
методом иммуноферментного анализа
"БиоСкрин-ВГС"

ТУ 9398-016-10839330-2012

Е-0246 **БиоСкрин-ВГС**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов "БиоСкрин-ВГС" предназначен для выявления IgG антител к вирусу гепатита С (ВГС) в сыворотке или плазме крови человека.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

На поверхности лунок полистироловых планшетов адсорбирована смесь очищенных рекомбинантных полипептидов «Core-c», «NS3-c», «NS4-c», «NS5-c», содержащих аминокислотную последовательность протективного белка (β -галактозидазы E.coli) и аминокислотные последовательности антигенных детерминант нуклеокапсидного и неструктурных белков NS3, NS4 и NS5 ВГС соответственно.

Положительный контрольный образец инактивированный K+ представляет собой сыворотку крови человека, содержащую антитела к ВГС и не содержащую антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антигена ВИЧ и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Отрицательный контрольный образец инактивированный K- представляет собой сыворотку крови человека, не содержащую антител к ВГС, ВИЧ-1, ВИЧ-2, антигена ВИЧ и HBsAg. Инактивирован прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Конъюгат представляет собой моноклональные антитела мыши против IgG человека, связанные с ферментом пероксидазой хрена. Поставляется в виде концентрата.

Раствор № 4 для разведения хромогена содержит субстрат ферментативной реакции.

Хромогеном является 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

Стоп-реагент представляет собой 1М раствор серной кислоты.

При инкубации образцов сыворотки в лунках планшета специфические к ВГС антитела связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя иммунные комплексы антиген-антитело. После удаления несвязавшихся антител в лунки добавляют конъюгат - мышиные моноклональные антитела к Fc-фрагменту IgG человека, меченные пероксидазой хрена, - который взаимодействует с комплексом антиген-антитело. После удаления несвязанных молекул конъюгата в лунки планшета добавляют индикаторный раствор, включающий субстрат и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Ферментативная реакция пероксидазы с хромогеном приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации специфических к ВГС антител в образце. После остановки реакции стоп-реагентом интенсивность окрашивания раствора измеряют на спектрофотометре по оптическому поглощению при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620-650 нм). Его величина пропорциональна концентрации специфических к ВГС антител в образце сыворотки или плазмы крови человека.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

Набор выпускается в виде набора компонентов, упакованных в коробку:

Компонент	Описание	Количество
Иммуносорбент	Разборный 96-луночный планшет для иммунологических реакций с прозрачным плоским дном лунок.	2 шт.
Положительный контрольный образец инактивированный К+	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость розового цвета.	0,7 мл 1 пробирка
Отрицательный контрольный образец инактивированный К-	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета.	0,7 мл 1 пробирка
Конъюгат	Опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета.	от 0,5 до 1,5 мл 1 пробирка
Концентрат раствора № 1 для отмывания планшетов (x25)	Пенящаяся прозрачная или опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре от 35 °С до 37 °С в течение 30 минут.	25 мл 2 флакона
Раствор № 2 для разведения сывороток	Прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	15 мл 1 флакон
Раствор № 3 для разведения конъюгата	Прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, при хранении допускается выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	25 мл 1 флакон
Раствор № 4 для разведения хромогена	Прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл 2 флакона
Хромоген	Прозрачная бесцветная жидкость.	2,5 мл 1 пробирка
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл 1 флакон
Ванночка для разведения реагентов	Ванночка из пластика для 8-ми канального дозатора.	2 шт.
Пленка для заклеивания планшета	Самоклеющаяся влагонепроницаемая пленка	2 шт.

Один набор рассчитан на проведение 192 анализов сыворотки (плазмы), включая контрольные.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Чувствительность

Чувствительность на «Стандартной панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела к ВГС» (ОСО 42-28-310-02П.), составляет 100 %.

3.2. Специфичность

Специфичность на «Стандартной панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела к ВГС» (ОСО 42-28-310-02П, ТУ), составляет 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Со всеми тестируемыми образцами, сточными растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, следует обращаться как с потенциально инфицированными объектами:

- не пипетировать растворы ртом, при работе использовать индивидуальные средства защиты (резиновые перчатки и защитные очки);
- все отработанные растворы и отходы после завершения анализа обрабатывать в соответствии с установленными нормами безопасности (например, в течение 16-18 часов в растворе гипохлорита натрия в конечной концентрации 1 %);
- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергать автоклавированию в течение 60 мин при +121 °С или сжигать;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-м раствором этилового спирта;
- утилизировать отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения анализа необходимо использовать:

- дистиллированная или деионизированная вода;
- хлорамин или перекись водорода для обеззараживания;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;
- пипетки одноканальные автоматические для подачи жидкостей в объеме от 10 до 1000 мкл;
- пипетки 12-канальные (8-канальные) автоматические для подачи жидкостей в объеме от 10 до 100 мкл;
- наконечники полипропиленовые вместимостью 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые вместимостью 1000 мкл;
- центрифуга настольная на 7-10 тыс. об/мин для получения и осветления образцов сыворотки/плазмы крови;
- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью 1,5-2,2 мл для получения, осветления и хранения образцов сыворотки/плазмы;
- мерный стакан или цилиндр вместимостью 500 мл;
- мерная посуда вместимостью до 25 мл;
- воздушный термостат на 37 °С;
- аппарат для промывки планшетов;

- встряхиватель (шейкер) для планшетов (не обязательно);
- спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- контейнер для сброса твердых отходов;
- контейнер для слива использованных жидкостей;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага;

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для проведения анализа используются образцы (сыворотка или плазма крови человека) в объеме 50 мкл.

В наборе могут быть исследованы образцы, содержащие цитрат натрия, гепарин или ЭДТА в качестве антикоагулянтов, а также образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Следует осветлять образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием. Собранные образцы сыворотки или плазмы хранят при температуре от 4 °С до 6 °С. Если образцы невозможно протестировать в течение 72 ч, то их следует хранить при температуре не выше минус 15 °С. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Помните, что исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, может привести к получению ложных результатов.

Каждый образец сыворотки или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

ВНИМАНИЕ! Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов!

Анализ проб следует проводить так, чтобы в случае отсутствия автоматического анализатора на одного оператора одновременно приходилось не более четырех планшетов.

Каждый исследуемый образец или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Условия и сроки хранения компонентов набора после вскрытия индивидуальной упаковки приведены в Таблице 1:

Таблица 1.

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	от 2 °С до 8 °С в плотно закрытом пакете	8 недель
K+, K-, конъюгат, концентрат раствора № 1, растворы № 2, № 3, № 4, хромоген	от 2 °С до 8 °С	8 недель
Стоп-реагент	от 2 °С до 8 °С	До окончания срока годности набора

Перед началом работы набор необходимо выдержать при комнатной температуре 30 минут.

Растворы № 2, K+, K-, стоп-реагент поставляются в готовом виде. Перед использованием флаконы с растворами № 2, № 3 интенсивно встряхнуть.

7.1.1. Приготовление рабочего раствора № 1 для промывания планшетов

Содержимое флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхнуть. При выпадении в концентрате кристаллов его следует прогреть перед разведением при температуре от 35 °С до 37 °С до полного растворения. 12 мл концентрата раствора № 1 перенести в мерную емкость, довести объем до метки 300 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать.

Готовый раствор хранить не более 24 ч при температуре от 4 °С до 12 °С или 4 часа при температуре от 18 °С до 24 °С.

7.1.2. Приготовление рабочего разведения конъюгата

Из пробирки с концентратом конъюгата отобрать 0,6 мл в чистую емкость и добавить 12 мл раствора № 3. Тщательно перемешать.

Готовый раствор конъюгата хранить не более 15 мин при температуре от 9 °С до 25 °С в защищенном от света месте.

7.1.3. Приготовление индикаторного раствора

Отобрать 10 мл раствора № 4, поместить в чистую емкость и добавить 1 мл хромогена. Тщательно перемешать.

Готовый раствор хранению не подлежит.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором хромогена, буферной смесью с гидроперитом и индикаторным раствором, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе пероксидазной реакции. Избегать также контакта раствора хромогена с металлом.

7.2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ

7.2.1. Планшет с иммобилизованными антигенами (иммуносорбент) перед использованием однократно промыть рабочим раствором № 1 автоматическим или ручным промывателем, полностью заполняя лунку раствором и выдерживая его в

лунках не менее 15 сек. По окончании промывки тщательно удалить влагу из планшета.

7.2.2. Во все лунки рабочего планшета внести по 50 мкл раствора № 2. В 88 из них добавить по 50 мкл испытуемых образцов сывороток, перемешивая в лунках пипетированием или встряхивателем.

В две лунки внести по 50 мкл раствора № 2 (контроль конъюгата);

В три из 6 оставшихся лунок внести по 50 мкл К-, в три лунки внести по 50 мкл К+.

Планшет заклеить пленкой и выдержать в течение 30 мин при температуре 37 °С.

Не располагать планшеты стопкой!

7.2.3. Удалить жидкость из лунок промывателем. Внести рабочий раствор № 1 и сразу удалить его. Затем планшет 5-кратно промыть рабочим раствором №1, каждый раз полностью заполняя лунки раствором и выдерживая раствор в лунках не менее 15 сек. Удалить влагу, как описано в п.7.2.1.

7.2.4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (п.7.1.2.). Планшет заклеить новым листом пленки и выдержать в течение 30 мин при температуре 37 °С, не располагая планшеты стопкой.

7.2.5. Удалить жидкость из лунок промывателем, затем планшет 6-кратно промыть рабочим раствором № 1, как описано в п.7.2.3. и удалить влагу.

7.2.6. В каждую лунку планшета внести по 100 мкл индикаторного раствора (п.7.1.3.). Планшет поместить в защищенное от света место на 15 мин при температуре от 15 °С до 25 °С.

Не располагать планшеты стопкой!

7.2.7. Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и немедленно приступить к определению оптической плотности (ОП). Учет результатов проводить при длине волны 450 (длина волны сравнения 620-680 нм при возможности одновременного двулучевого учета). Допускается учет результатов при одной длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Результаты, полученные для контрольных образцов, должны удовлетворять следующим требованиям:

среднее значение ОП в лунках с положительным контролем ОПср(К+):	не менее 0,80 о.е.
среднее значение ОП в лунках с отрицательным контролем ОПср(К-):	не более 0,15 о.е.;
среднее значение ОП контроля конъюгата:	не более 0,10 о.е.;

При несоблюдении любого из этих требований анализ необходимо повторить.

При соблюдении всех требований перейти к учету результатов анализа исследуемых образцов.

Рассчитать критическое значение ОП (ОПкрит) по формуле:

$$\text{ОПкрит} = \text{ОПср(К-)} + A,$$

где коэффициент $A = 0,18$.

Результат исследования считается **положительным**, если ОП для исследуемого образца не менее ОПкрит.

Результат исследования считается **отрицательным**, если ОП для исследуемого образца менее ОПкрит.

Если ОП для исследуемого образца ниже ОПкрит, но существенно превышает значения ОП для большинства образцов, рекомендуется исследовать этот образец повторно.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор транспортировать и хранить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 °С до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование в течение 3 сут при температуре от 9 °С до 30 °С.

Условия отпуска: для диагностики *in vitro* в лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждениях.

Рекламации на качество набора направлять в ЗАО БТК «Биосервис» по адресу: 115088, г. Москва, а/я 20, тел./факс (495) 674-5605.

10. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.