

### **ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ**

Набір реагентів для імуноферментного виявлення імуноглобулінів класів G і M  
індивідуальних білків вірусу гепатиту С (Core, NS3, NS4, NS5)

#### **«ВГС - СПЕКТР - БЕСТ» (комплект 1)**

«ВГС – СПЕКТР – БЕСТ» представляє собою набір реагентів, основою якого є рекомбінантні антигени ВГС, відповідні ділянок білків, кодованих структурної (основний) і неструктурної (NS3, NS4, NS5) областю генома ВГС, іммобілізовані на поверхні лунок розбірного полістиролового планшета роздільно.

Один набір розрахований на 24 аналізи, включаючи контролю. Передбачено використання набору частинами, залежно від кількості проб (від 2 аналізованих зразків до 22). Комплектується усіма необхідними реагентами, крім дистильованої води.

#### **1. ПРИЗНАЧЕННЯ**

Набір реагентів призначений для виявлення імуноглобулінів класів G і M до індивідуальних білків вірусу гепатиту С в сироватці (плазмі) крові, а також підтвердження позитивних результатів ІФА, отриманих при скринінгу.

#### **2. СКЛАД НАБОРУ**

- планшет розбірний з іммобілізованими 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 хрину) - 1 фл, 2 фл. або 3 фл.
- розчин для розведення сироваток (РС, рідина червоного кольору) - 1 фл;
- розчин для попереднього розведення (РПР) - 1 фл. або 2 фл.,
- розчин для розведення кон'югату (РК, рідина зеленого кольору) - 1 фл.;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Т × 25) - 1 фл;
- субстратний буферний розчин (СБР) - 1 фл;
- тетраметілбензидін (ТМБ), концентрат - 1 фл;
- стоп-реагент - 1 фл;

**Примітки.** 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.

Зразки сироватки (плазми) крові можна зберігати при температурі від 2 до 8 ° С не більше 5 діб за умови відсутності мікробної контамінації або при температурі мінус 20 ° С (і нижче) не більше 3 міс. Слід уникати багаторазового заморожування / відтавання, так як це може призвести до отримання неправильних результатів. Після розморожування зразки слід ретельно перемішати.

##### **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, стор 3.) і розвести його дистильованою водою до зазначеного в таблиці об'єму або вміст 1 флакона - до 700 мл.

**Зберігання:** при (2-8) ° С до 72 ч.

###### **3.1.2. Розчин кон'югату**

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

Приготувати концентрований розчин кон'югату шляхом розчинення містимого флакона з кон'югатів 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, що входить до складу набору, безпосередньо перед використанням!

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

**Таблиця витрат реагентів**

	Кількість використовуваних стрипів										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промиваючий розчин											
ФСБ-Тх25, мл.	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистильована вода, мл.	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.	2×а	3×а	4×а	5×а	6×а	7×а	8×а	9×а	10×а	11×а	12×а
	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

а = ▲▲▲ мкл

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

Кон'югат в робочому розведенні зберігання не підлягає.

### 3.1.3. Розчин ТМБ в робочому розведенні

**Увага!** Розчин ТМБ готувати в пластиковій ванночці, що входить до складу набору, безпосередньо перед використанням! Рекомендуємо виділити наконечники для піпеток, які використовувати тільки для роботи з ТМБ.

В 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.

## 3.2. ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Набір розрахований на 24 аналізи, включаючи контролі. Передбачено використання набору частинами, залежно від кількості аналізованих проб:

Кількість проб що аналізуються	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22
Кількість використовуваних зразків											

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. Запаковані таким чином стрипи зберігати при (2-8) ° С до 1 місяця.

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 домогтися повного спорожнення лунок після кожного їх заповнення. Час між заповненням і спорожненням лунок повинно бути не менше 30 сек.

Після закінчення промивання необхідно ретельно видалити вологу з лунок, постукуючи перевернутими стрипами по складеній в декілька шарів фільтрувального паперу. Не допускати висихання лунок стрипів між окремими операціями при постановці реакції.

3.2.2. В лунках стрипів на лавах А, Е іммобілізований антиген, кодується структурної (основний) областю генома, на лавах В, F іммобілізований антиген, відповідний неструктурної області генома ВГС - NS3, на рядах С, G - NS4, на рядах D, H — NS5. Тому всі контролі і досліджувані сироватки слід вносити в 4 лунки вертикального ряду відповідно до схеми (стор. 15) для проведення реакції з кожним антигеном окремо.

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

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

**Схема постановки аналізу**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>core</b>	<b>A</b>	Контроль К+	Сироватка № 1	Сироватка № 3	Сироватка № 5	Сироватка № 7	Сироватка № 9	Сироватка № 11	Сироватка № 13	Сироватка № 15	Сироватка № 17	Сироватка № 19	Сироватка № 21
<b>NS3</b>	<b>B</b>												
<b>NS4</b>	<b>C</b>												
<b>NS5</b>	<b>D</b>												
<b>core</b>	<b>E</b>	Контроль К-	Сироватка № 2	Сироватка № 4	Сироватка № 6	Сироватка № 8	Сироватка № 10	Сироватка № 12	Сироватка № 14	Сироватка № 16	Сироватка № 18	Сироватка № 20	Сироватка № 22
<b>NS3</b>	<b>F</b>												
<b>NS4</b>	<b>G</b>												
<b>NS5</b>	<b>H</b>												

Стрипи заклеїти плівкою та інкубувати у відповідності з обраною процедурою:

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

*процедура 2* - 37 ° С 1:00, 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.

Стрипи заклеїти плівкою, інкубувати 30 хвилин при 37 ° С.

3.2.5. 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).

3.2.6. 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.

Стрипи інкубувати 30 хв при (18-25) ° С або 20 хв при 37 ° С в умовах, захищених від світла.

3.2.7. Реакцію зупинити додаванням в усі лунки по 100 мкл стоп-реагенту і негайно виміряти оптичну щільність (ОП).

**Увага!** Слід уникати потрапляння 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:

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

Облік результатів аналізу сироваток проводити роздільно до кожного антигену ВГС. ОГ критичну (ОГ крит) розрахувати за формулами:

**ОГ крит. (core)** = ОГ К-(core) + 0,2;

**ОГ крит. (NS3)** = ОГ К-(NS3) + 0,2;

**ОГ крит. (NS4)** = ОГ К-(NS4) + 0,2;

**ОГ крит. (NS5)** = ОГ К-(NS5) + 0,2.

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

КП (core) = ОГ зр. (core) / ОГ крит. (core)

КП (NS3) = ОГ зр. (NS3) / ОГ крит. (NS3)

КП (NS4) = ОГ зр. (NS4) / ОГ крит. (NS4)

КП (NS5) = ОГ зр. (NS5) / ОГ крит. (NS5).

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

Результати аналізу вважати позитивними, якщо значення КП  $\geq$  1:

1) для основного антигена;

або

2) для будь-яких двох NS антигенів.

Результат розцінювати як невизначений, якщо тільки з одним з неструктурних білків отримана позитивна реакція (КП  $\geq$  1).

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

## 5. УМОВИ ЗЕРІГАННЯ І ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набори зберігати і транспортувати при (2-8)°С. Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 10 діб.

Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертається 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

### СХЕМА АНАЛІЗУ

<b>Підготувати</b>	Промивальний розчин (п. 3.1.1), концентрований розчин кон'югату (п. 1.1.2)
<b>Промивання</b>	1 раз по 400 мкл.
<b>Внести</b>	По 60 мкл. РС
<b>Внести</b>	По 40 мкл. К+, К- та досліджуваних зразків
<b>Інкубація</b>	Див. п. 3.2.2
<b>Підготувати</b>	Розчин кон'югату в робочому розведенні (п. 3.1.2)
<b>Промивання</b>	5 разів по 400 мкл.
<b>Внести</b>	По 100 мкл. розчину кон'югату в робочому розведенні
<b>Інкубація</b>	30 хв. при 37 С під плівкою
<b>Промивання</b>	5 разів по 400 мкл.
<b>Підготувати</b>	Розчин ТМБ (п. 3.1.3)
<b>Внести</b>	По 100 мкл. розчину ТМБ
<b>Інкубація</b>	Див. п. 3.2.6
<b>Внести</b>	По 100 мкл. стоп-реагенту
<b>Облік результатів</b>	За допомогою спектрофотометру при довжині хвилі 450 нм/620 нм