

**ІНСТРУКЦІЯ**  
тест-система імуноферментна для визначення індексу авідності антитіл класу IgG  
до вірусу гепатиту С  
**«ВГС-авідність-БЕСТ»**

**Призначення**

Набір призначений для визначення індексу авідності антитіл класу IgG до вірусу гепатиту С у сироватці (плазмі) крові людини імуноферментним методом з метою специфічної діагностики первинної інфекції.

**Склад набору:**

- **імуносорбент** – планшет з сорбованими рекомбінантними антигенами: структурним (core-Ag) і неструктурним (NS3, NS4 і NS5) білкам вірусу гепатиту С;
- **кон'югат** (концентрат), рідкий – моноклональні антитіла до імуноглобулінів G людини, кон'юговані з пероксидазою хрину;
- **контрольний високоавідний позитивний зразок**, інактивованний (K<sub>1</sub>+), прозора або злегка опалесцююча рідина червоного кольору;
- **контрольний низькоавідний позитивний зразок**, інактивованний (K<sub>2</sub>+), прозора або злегка опалесцююча рідина оранжевого кольору;
- **контрольний негативний зразок**, інактивованний (K-), прозора або злегка опалесцююча рідина зеленого кольору;
- **блок-розчин (БР)**, рідина блакитного кольору, допустиме утворення осаду;
- **розчин для розведення кон'югату (РРК)**, прозора або злегка опалесцююча рідина жовтого кольору, допустиме утворення осаду;
- **розчин денатуруючий (РД)**, прозора рідина фіолетового кольору;
- **розчин порівняння (РП)**, прозора рідина зелено-блакитного кольору;
- **концентрат фосфатно-сольового буферного розчину** з твином (ФСБ-Тх25) (ПР, 25-кратний концентрат фосфатно-сольового розчину з твином-20), прозора або злегка опалесцююча рідина, безбарвна або світло-жовтого, допустиме утворення осаду;
- **субстратний буферний розчин (СБ)**, прозора безбарвна рідина;
- **тетраметилбензидин (ТМБ)** прозора безбарвна рідина;
- **стоп-реагент**- прозора безбарвна рідина.

Набір розрахований на проведення 48 визначень, включаючи контрольні.

**Заходи безпеки**

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.

**1. Перелік устаткування, матеріалів і реактивів, необхідних для постановки ІФА.**

Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5-3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

**2. Приготування робочих розчинів. Усі розчини необхідно відбирати одноразовими наконечниками.**

Об'єми реагентів при проведенні аналізу на необхідній кількості стрипів наведені у таблиці 1.

**Витрати реагентів набору залежно від кількості використовуваних стрипів. Таблиця 1**

Кількість стрипів	Робочий промивальний розчин		Робочий розчин кон'югату		СС	
	ПР (конц.х25) (мл)	Вода дистильована(мл)	Кон'югат (конц. х 11) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
2	8,0	192,0	0,20	2,0	0,20	2,0
4	16,0	384,0	0,40	4,0	0,40	4,0
6	24,0	576,0	0,60	6,0	0,60	6,0
8	32,0	768,0	0,80	8,0	0,80	8,0
10	40,0	960,0	1,00	10,0	1,00	10,0
12	50,0	1200,0	1,20	12,0	1,20	12,0

**ПР - робочий промивальний розчин.** Вміст флакону з концентратом промивального розчину ретельно перемішати. Для приготування робочого промивального розчину необхідну кількість концентрату промивального розчину відібрати в окрему ємкість і додати відповідну кількість води дистильованої (див. табл. 1,2). Отриманий розчин ретельно перемішати.

Зберігання: робочий промивальний розчин зберігати не більше 3-х діб за температури від 2 °С до 8 °С.

**K<sub>1</sub>+** - контрольний високоавідний позитивний зразок, готовий для використання.

**K<sub>2</sub>+** - контрольний низькоавідний позитивний зразок, готовий для використання.

**K-** - контрольний негативний зразок, готовий для використання.

**БР** – для розведення досліджуваних зразків, готовий для використання. Перед використанням БР ретельно перемішати.

**РРК** - розчин для розведення концентрату кон'югату, готовий для використання. Перед використанням вміст флакону ретельно перемішати.

**Кон'югат**, робочий розчин, готувати перед використанням. Необхідну кількість РРК перенести в чисту ємкість, додати відповідну кількість ретельно перемішаного концентрату кон'югату (згідно табл. 1 та 2) та обережно перемішати, не допускаючи спінювання (інтенсивне перемішування не застосовувати!).

Зберігання: робочий розчин кон'югату стабільний протягом 12 год у захищеному від світла місці за температури від 18 °С до 24 °С.

**ТМБ** - хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, готовий для застосування. Перед використанням вміст флакону ретельно перемішати.

**СБ** - субстратний буферний розчин для приготування субстратної суміші, готовий для використання. Перед використанням ретельно перемішати.

**РД** – розчин денатуруючий, готовий для використання. Перед використанням вміст флакону ретельно перемішати.

**РП** – розчин порівняння, готовий для використання. Перед використанням вміст флакону ретельно перемішати.

**СС** – субстратна суміш, готувати перед використанням. Необхідний об'єм ТМБ розвести відповідним об'ємом СБ (див. таблиці № 1 і 2), ретельно перемішати до повного розчинення. Зберігання: допустиме зберігання СС не більше 10 год у захищеному від світла місці за температури від 18 °С до 24 °С у хімічно чистих флаконах або спеціальній ємкості, призначеній для постановки ІФА на автоматичних аналізаторах для імуноферментного аналізу відкритого типу.

**Субстратна суміш повинна бути безбарвною!**

**Стоп - реагент** - готовий для використання.

Зберігання компонентів: після відкриття флаконів, реагенти, що залишилися невикористаними, зберігати протягом терміну придатності набору за температури від 2 °С до 8 °С.

### **3. Підготовка досліджуваних зразків.**

Для виключення хибних результатів не можна піддавати досліджувані зразки термоінактизації, необхідно відбирати і зберігати їх в умовах, що запобігають бактеріальному росту. Кожен зразок сироватки слід відбирати новим наконечником! Відібрані зразки зберігати не більше 3 діб за температури від 2 °С до 8 °С. Більш тривале зберігання допустиме за температури не вище мінус 20 °С (зразки можуть піддаватися заморожуванню і відтаванню не більше 1 разу). Дослідження зразків з вираженим бактеріальним ростом, гемолізом і гіперліпідемією не допускається, оскільки це може дати неправильний результат. Зразки сироватки (плазми) крові, що містять агрегати або осад, необхідно «освітлювати» центрифугуванням.

### **4. Проведення ІФА при ручній постановці.**

4.1. Перед використанням набору необхідно відкрити фольгований пакет, відступивши 1,0 см від краю пакету. Дістати з пакету рамку і необхідну кількість стрипів. Пакет з невикористаними стрипами ретельно герметизувати (не видаляючи осушувач!). Для цього край пакету потрібно згорнути 2-3 рази і скріпити зверху скріпкою для фольгованого пакету або помістити відкритий пакет з імуносорбентом в поліетиленовий пакет з замком Zip-Lock.

**Перед використанням імуносорбент не промивати.**

4.2. У лунки двох паралельних (парного та непарного) стрипів імуносорбенту піпеткою змінного об'єму внести по 100 мкл K<sub>1</sub>+, K<sub>2</sub>+, K-.

Наприклад: у 2 лунки A1 і A2 - K<sub>1</sub>+, у 2 лунки B1 і B2 - K<sub>2</sub>+, у 4 лунки C1 і C2, D1 и D2 - K-.

До інших лунок внести по 30 мкл БР і по 70 мкл досліджуваних зразків. Кожен зразок внести попарно в сусідні лунки двох паралельних стрипів (парного та непарного). Вміст лунок ретельно перемішати обережним постукуванням по краю планшету. Планшет закрити кришкою або захисною плівкою і витримати у термостаті протягом 1 год за температури (37,0 ± 0,5) °С.

4.3. Вміст лунок видалити в ємкість для інфікованого матеріалу. Планшет промити 4 рази робочим розчином ПР, залити його по самі вінця лунок (не менше 380 мкл в лунку), витримуючи 40 сек, і видалити промивальний розчин в ємкість для збору інфікованого матеріалу.

4.4. У лунки непарних стрипів внести по 100 мкл розчину порівняння. У лунки парних стрипів – по 100 мкл розчину денатуруючого. Планшет закрити кришкою і витримати 8 хв за температури від 20°С до 24 °С.

4.5. Вміст лунок видалити в ємкість для збору інфікованого матеріалу, потім планшет промити 4 рази робочим розчином ПР (див. п. 4.3.).

4.6. У всі лунки стрипів внести по 100 мкл кон'югату в робочому розведенні. Планшет закрити кришкою і витримати 30 хв за температури (37±0,5) °С.

4.7. Вміст лунок видалити в ємкість для збору інфікованого матеріалу, потім планшет промити 4 рази робочим розчином ПР (див. п. 4.3.).

4.8. У всі лунки стрипів внести по 100 мкл СС. Планшет закрити кришкою і витримати 30 хв у захищеному від світла місці за температури від 20 °С до 24 °С.

4.9. Реакцію зупинити додаванням у всі лунки по 50 мкл стоп реагенту і провести облік результатів.

Схема проведення ІФА наведена у Додатку 1.

## 5. Облік результатів.

Облік результатів проводити спектрофотометричеськи при 2-х довжинах хвиль - 450 нм і 620-680 нм з налаштуванням приладу по «повітрю». Допустимий облік результатів при одній довжині хвилі - 450 нм. Реакцію враховувати, якщо значення оптичної густини (ОГ) в лунках з розчином порівняння (непарні стрипи): для  $K_{1+}$  - не менше 1,5, для  $K_{2+}$  - не менше 0,5, а середнє значення ОГ у всіх лунках з К- - не більше 0,5.

Індекс авідності розраховувати за формулою:

$$\text{Індекс авідності} = \frac{\text{ОГ досліджуваного зразка (реакція з розчином, що денатурує білок)} / \text{ОГ досліджуваного зразка (реакція з розчином порівняння)} \times 100 \%}{}$$

Отримані результати вважати достовірними, якщо індекс авідності для  $K_{1+}$  не менше 70 %, а індекс авідності для  $K_{2+}$  не більше 37 %.

**Увага!** Даний набір не призначений для скринінгових досліджень і оптичні густини зразків не відповідатимуть результатам скринінгу на анти-НСV.

## 6. Інтерпретація результатів.

Якщо індекс авідності досліджуваної позитивної сироватки менше 37 %, то сироватка містить низькоавідні IgG HCV антитіла, що вказує на первинну інфекцію. Якщо індекс авідності досліджуваної позитивної сироватки від 37 % і більше, то сироватка містить високоавідні IgG HCV антитіла.

1. Значення індексу авідності досліджуваної позитивної сироватки від 32 % до 57 % (з використанням даного тесту від 37 % до 72 %) вказує на паст-інфекцію.

2. Якщо індекс авідності досліджуваної позитивної сироватки більше 64 % (з використанням даного тесту більше 66 %) – це вказує на загострення хронічного процесу.

Для уточнення стадії захворювання і прогнозування перебігу хвороби необхідне медичне обстеження і комплексна динамічна оцінка серологічних маркерів HCV. Використання лише даного тесту недостатньо, оскільки можливі хибнопозитивні результати у хворих гіпергаммоглобулінемією, системними захворюваннями сполучної тканини, хронічними захворюваннями печінки, у онкологічних хворих, при порушеннях аутоімунної відповіді і іншими патологіями.

## 7. Задати програму проведення ІФА та увімкнути аналізатор.

7.1. Приготований робочий промивальний розчин залити в призначену для нього ємкість, інші робочі розчини та реагенти помістити в спеціальні контейнери або ємкості, контрольні зразки  $K_{+}$  та  $K_{-}$  - у флаконах, зразки досліджуваних сироваток – у флаконах або пробірках в об'ємі не менше 300 мкл встановити у відповідні штативи аналізатора; помістити в аналізатор необхідну кількість імуносорбентів.

7.2. Після закінчення аналізу прилад видає протокол за результатами дослідження, у якому дається характеристика кожного досліджуваного зразка і контрольних зразків  $K_{+}$  і  $K_{-}$ .

7.3. Реакцію враховувати, якщо значення оптичної густини (ОГ) в лунках з розчином порівняння (непарні стрипи): для  $K_{1+}$  - не менше 1,5, для  $K_{2+}$  - не менше 0,5, а середнє значення ОГ у всіх лунках з К- - не більше 0,5. Далі облік результатів здійснювати аналогічно п 5.

### Термін придатності. Умови транспортування та зберігання.

Термін придатності – 14 місяців.

Зберігання – у сухому, захищеному від світла місці за температури від 2 °С до 8 °С.

Транспортування - за температури від 2 °С до 8 °С. Допускається зберігання або транспортування тест-систем за температури не вище 22°С протягом десяти діб за температури не вище 28°С протягом 5 діб. Заморожування 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.

<b>1</b>	<b>Внести</b>	По 100 мкл K <sub>1</sub> <sup>+</sup> , K <sub>2</sub> <sup>+</sup> , K <sup>-</sup>
<b>2</b>	<b>Внести</b>	По 30 мкл БР
<b>3</b>	<b>Внести</b>	По 70 мкл зразків досліджуваних сироваток
<b>4</b>	<b>Інкубувати</b>	1 год, (37,0 ± 0,5) °С, термостат
<b>5</b>	<b>Промити планшет</b>	Робочий ПР, не менше 380 мкл, 4 рази
<b>6</b>	<b>Внести</b>	По 100 мкл РП, РД
<b>7</b>	<b>Інкубувати</b>	8 хв, 18-24 °С у захищеному від світла місці
<b>8</b>	<b>Промити планшет</b>	Робочий ПР, не менше 380 мкл, 4 рази
<b>9</b>	<b>Внести</b>	По 100 мкл робочий розчин кон'югату
<b>10</b>	<b>Інкубувати</b>	30 хв, (37,0 ± 0,5) °С, термостат
<b>11</b>	<b>Промити планшет</b>	Робочий ПР, не менше 380 мкл, 4 рази
<b>12</b>	<b>Внести</b>	По 100 мкл СС
<b>13</b>	<b>Інкубувати</b>	30 хв, 18-24 °С у захищеному від світла місці
<b>14</b>	<b>Внести</b>	По 50 мкл стоп-реагента
<b>15</b>	<b>Облік результатів</b>	450 нм/620-680 нм або 450 нм