

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для імуноферментного виявлення імуноглобулінів класів G і M до шести індивідуальних білків вірусу гепатиту С (Core-пеп, Core-рек, NS3, NS4-пеп, NS4-рек, NS5)
«ВГС - СПЕКТР - БЕСТ» (комплект 2)

ПРИЗНАЧЕННЯ

Підтвердження наявності виявлених при скринінгу антитіл класів G і M до окремих антигенів ВГС в сироватці (плазмі) крові і препаратах крові людини, методом непрямого імуноферментного аналізу (ИФА) на твердофазному носії.

СКЛАД І КОМПЛЕКТАЦІЯ НАБОРУ

Базовий варіант комплекта містить:

Імуносорбент	Синтетичні пептиди і рекомбінантні антигени ВГС, шр відповідають відповідним ділянкам білків, що кодуються структурною (core) і неструктурною (NS3, NS4, NS5) областями генома ВГС, сорбовані в лунках типів полістиролових планшетів з плоским дном для ИФА; кожний антиген сорбований на окремому стрипі; по краю стрипів нанесене маркування у вигляді смужок: на стрипах з core-пепт. – коричневого кольору, з core-рек. – червоного кольору, з NS ₃ – синього кольору, з NS ₄ -рек. – зеленого кольору, з NS ₄ -пепт. – чорного кольору, з NS ₅ – жовтого кольору. Стрипи упаковані окремо в пакети з плівки поліетиленової	core-p – 4 стр. core-p – 4 стр. NS ₃ -p – 4 стр. NS ₄ -p. – 4 стр. NS ₄ -п – 4 стр. NS ₅ -p – 4 стр.
Контрольний позитивний зразок (K ⁺)	Інактивований; прозора або зі слабкою опалесценцією рідина малинового кольору	1 фл. (0,5 мл)
Контрольний негативний зразок (K ⁻)	Інактивований; прозора або зі слабкою опалесценцією рідина синього кольору.	1 фл. (1,0 мл)
Кон'югат	Антитіла діагностичні проти IgG і IgM людини з пероксидазою хрому; прозора рідина червоного кольору	1 фл. (2,0 мл)
25-кратний концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном [ФСБ-Т(x25)]	Прозора або трохи опалесцююча, безбарвна рідина, що піниться; можливе випадіння осаду солей, що розчиняються при температурі 37 °C протягом 30 хв	1 фл. (80 мл) или 2 фл. (по 40 мл)
Розчин для розведення зразків (РРЗ)	Опалесцююча рідина синьо-фіолетового кольору, допускається випадіння незначного осаду	2 фл. (по 12 мл)
Розчин для розведення кон'югата (РРК)	Опалесцююча рідина, безбарвна або з жовтуватим відтінком, допускається випадіння незначного осаду	2 фл. (по 12 мл)
Цитратний буферний розчин (ЦБР)	Прозора, безбарвна рідина	2 фл. (по 12 мл)
Хромоген (ТМБ)	Розчин тетраметилбензидину; прозора рідина, безбарвна або з жовтуватим відтінком	1 фл. (2,5мл)
Стоп-реагент	Прозора, безбарвна рідина	1 фл. (25 мл)

Примітки. 1. Набір містить всі реагенти, необхідні для постановки ИФА, крім очищеної (дистильованої або деонізованої) води.

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

ОСНОВНІ СПОЖИВЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовий варіант комплекту розрахований на дослідження 32 зразків, включно з контрольними (на контрольні зразки використовується 18 лунок – по 3 лунки на стрип).

Передбачена можливість проведення окремих досліджень з використанням необхідної кількості стрипів:

Кількість стрипів	1/6	2/12	3/18	4/24
-------------------	-----	------	------	------

З кожним антигеном/всього				
Кількість досліджуваних зразків	1-5	6-13	14-21	22-29

ПРИНЦИП ДІЇ

Основою є синтетичні пептиди і рекомбінантні білки, що містять антигенні детермінанти білків, що кодується структурною (core) і неструктурною (NS3, NS4, NS5) областями генома ВГС. Окремо сорбовані на поверхні лунок полістиролових планшетів антигени (core-пептидний, core-рекомбінантний, NS₃-рекомбінантний, NS₄-рекомбінантний, NS₄-пептидний, NS₅-рекомбінантний) утворюють комплекси з відповідними антитілами з сироватки (плазми) крові людини, які виявляються за допомогою кон'югата антитіл проти імуноглобулінів людини з пероксидазою хрому.

АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфічність становить - 100%.

Чутливість становить - 100%.

ДОСЛІДЖУВАНІ ЗРАЗКИ

Зразки, що містять частинки фібрину або інші видимі оком домішки, перед дослідженням освітлити центрифугуванням (10-15 хв при 2500-3000 об/хв). Для виключення хибно позитивних результатів не рекомендується аналізувати сироватки з мікробним проростом, гемолізом, підвищеним вмістом ліпідів.

Для дослідження зразків імуноглобулінів людини вихідні розчини розвести ФСБ-Т у співвідношенні 1:10, ліофільно висушені препарати крові попередньо відновити згідно з інструкції з їх використання, потім розвести з ФСБ-Т у співвідношенні 1:10.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

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.

СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ

1. Обладнання та матеріали

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

2. ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ І РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ИФА

Всі реагенти до початку аналізу мають бути витримані не менше 30 хв при температурі від 18 до 25 °С. Імуносорбент витримати в упакованому вигляді, для того щоб уникнути конденсації вологи всередині лунок.

2.1. Приготування розчину для відмивання планшетів (ФСБ-Т)

Для проведення аналізу з використанням цілого планшета (12 стрипів) 40 мл ФСБ-Т(х25) довести водою очищеною до 1000 мл.

Для проведення аналізу на 6 стрипах 20 мл ФСБ-Т(х25) довести водою очищеною до 500 мл.

При випаданні осаду солей в концентрації його необхідно прогріти перед розведенням при 37 °С до повного розчину осаду. Розчин зберігати при температурі від 2 до 8 °С не більше 14 діб.

2.2. Приготування робочого розчину кон'югата

При постановці на 6 стрипах до 6 мл РПК додатимкл кон'югата¹.

При постановке на 12 стрипах к 12 мл РПК додатимкл кон'югата².

Об'єм кон'югату, що вноситься вказується для кожної серії набору

Розчин готувати за 10-20 хв до постановки. Розчин стабільний не більше 3 год при температурі від 18 до 25 °С.

2.3. Приготування розчину хромогену

Готувати безпосередньо перед використанням, уникаючи потрапляння прямого сонячного світла.

При постановці на 6 стрипах 0,6 мл ТМБ змішати з 6 мл ЦБР; при постановці на 12 стрипах 1,2 мл ТМБ змішати з 12 мл ЦБР; ретельно перемішати.

Розчин стабільний не менше 3 годин при температурі від 18 до 25 °С в захищеному від світла місці

Примітка: Посуд і наконечники піпеток, що контактували з розчином хромогену, відмивати без використання синтетичних мийних засобів.

2.4. Приготування інших реагентів

РРЗ перед використанням необхідно ретельно перемішати через можливість випадіння осаду. Імуносорбент, К⁺, К⁻, стоп-реагент готові до використання.

Після відкриття упаковок невикористані реагенти допускається зберігати в щільно зачинених упаковках при температурі від 2 до 8 °С до того як термін придатності спливе.

3. Проведення ИФА

3.1. Витягти з упаковки рамку планшета і необхідну кількість стрипів з кожним антигеном. Невикористані стрипи допускається зберігати в щільно зачиненому пакеті з вологопоглиначем при температурі від 2 до 8 °С до того як термін придатності спливе. Розмістити стрипи в рамці, згідно з схемою постановки.

Рекомендована схема постановки ИФА (на 2 стрипах з кожним антигеном)

	core-p	core-p	NS ₃ -p	NS ₄ -p.	NS ₄ -п	NS ₅ -p	core-p	core-p	NS ₃ -p	NS ₄ -p.	NS ₄ -п	NS ₅ -p
A	K ⁺	K ⁺	K ⁺	K ⁺	K ⁺	K ⁺	№6	№6	№6	№6	№6	№6
B	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	№7	№7	№7	№7	№7	№7
C	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	№8	№8	№8	№8	№8	№8
D	№1	№1	№1	№1	№1	№1	№9	№9	№9	№9	№9	№9
E	№2	№2	№2	№2	№2	№2	№10	№10	№10	№10	№10	№10
F	№3	№3	№3	№3	№3	№3	№11	№11	№11	№11	№11	№11
H	№4	№4	№4	№4	№4	№4	№12	№12	№12	№12	№12	№12
G	№5	№5	№5	№5	№5	№5	№13	№13	№13	№13	№13	№13

3.2. В кожну лунку внести по 80 мкл РРЗ.

3.3. В одну лунку (нпр., А) стрипа з кожним антигеном внести 20 мкл K⁺, в дві (нпр., В,С) – по 20 мкл K⁻, в інші лунки – по 20 мкл досліджуваних зразків, ретельно перемігати пікетуванням (не менше 3 разів) або на шейкері з малою швидкістю (100 об/хв) протягом 30 с, колір РРЗ при цьому має змінитися з синьо-фіолетового на зелений.

3.4. Планшет закрити кришкою або плівкою та інкубувати згідно з обраною процедурою:

процедура 1 – 30 хв при 37 °С на шейкері (500 об/хв);

процедура 2 – 1 год при 37 °С в термостаті.

3.5. Після закінчення інкубації аспірувати вміст лунок і промити лунки планшета чотири рази, додаючи в кожну лунку не менше 400 мкл робочого промивного розчину. Час між заповненням і аспірацією (замочуванням) має бути не менше 30 сек.

Рекомендовано використовувати:

- режим відмивання з перепоповненням – «overflow» - з внесенням в лунку по 600-700 робочого промивного розчину;

- поперечну аспірацію розчину з лунок – режим «crosswise».

Необхідно слідкувати за повною аспірацією після кожного циклу відмивки (залишковий об'єм в лунках не має перевищувати 10 мкл).

Повністю видалити вологу з лунок, перегорнувши планшет на сухий чистий фільтрувальний папір.

3.6. Перемішати робочий розчин конюгату і внести його по 100 мкл в кожну лунку. Планшет закрити кришкою або плівкою і витримати протягом 30 хв в термостаті при температурі 37 °С.

3.7. Стрипи промити ФСБ-Т 6 разів з використанням звичайного промивного пристрою або 5 разів в режимі "overflow" (см. п. 3.5).

3.8. В кожну лунку внести по 100 мкл свіжо приготованого розчину хромогену, витримати 30 хв при температурі від 18 до 25 °С в захищеному від світла місці.

3.9. В кожну лунку (в тій же послідовності, в якій вносився розчин хромогену) внести по 100 мкл стоп-реагенту і через 2-3 хв, але не пізніше ніж через 10 хв врахувати результати.

РЕЄСТРАЦІЯ І ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати ИФА реєструвати спектрофотометрично, вимірюючи оптичну густину (ОГ) при двох довжинах хвиль – 450 нм і 620-650 нм. При відсутності референс-фільтру на 620-650 нм оптичну густину (ОГ) вимірювати при довжині хвилі 450 нм, а виведення спектрофотометра на нульовий рівень ("бланк") здійснювати за повітрям.

Результат ИФА враховувати при дотриманні наступних умов:

ОГ в лунках с K⁺ (ОГ_{K⁺}) – не менше 0,5;

ОГ в лунках с K⁻ (ОГ_{K⁻}) - не більше 0,25.

В іншому разі дослідження повторити.

Для кожного антигену розразувати критичне значення ОГ (ОГ_{крит}) за формулою

$$ОГ_{крит} = ОГ_{K-cp} + 0,150;$$

где ОГ_{K-cp} - середнє значення ОГ в лунках с K⁻ відповідного стрипа.

Результати враховувати по кожному антигену окремо.

Зразки з нижче ОГ_{крит} за всіма антигенами вважають негативними (не містять антитіл до ВГС).

Зразки з ОГ, більшою або рівною більшєй или равной ОГ_{крит} за двома однойменними або двома і більше різно-йменними антигенами, вважають позитивними.

Зразки з **ОГ**, більшою або рівною **ОГ_{крит}** за одним антигеном, вважають сумнівними. Сумнівні зразки мають бути досліджені в інших підтверджуючих тестах (імуноблотинг, ПЛІР-аналіз) або повторним дослідженням сироватки (плазми) крові данного пацієнта в системі «ВГС-антитіла-БЕСТ» через 3-6 місяців.

Для інтерпретації результатів дослідження можна використовувати коефіцієнт позитивності (КП), який розраховується для кожного антигену за формулою:

ОГзр.
КП = -----
ОГ крит.

Якщо за двома і більше антигенам або тільки за одним Core-антигеном $KП \geq 1,0$, досліджуваний зразок оцінювати як позитивний.

Якщо для кожного антигена $KП < 1,0$, досліджуваний зразок оцінювати як негативний.

Якщо $KП \geq 1,0$ тільки за одним не структурним антигеном (или NS_3 , или NS_4 или NS_5), досліджуваний зразок оцінювати як сумнівний.

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, 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.

СХЕМА ПОСТАНОВКИ ІФА
«ВГС - СПЕКТР - БЕСТ» (комплект 2)

Використовувати тільки після ретельного ознайомлення з інструкцією.

Внести	В кожну лунку – по 80 мкл РРЗ; в одну лунку стрипа з кожним антигеном – 20 мкл K^+ , в дві лунки – по 20 мкл K^- , в інші лунки – по 20 мкл досліджуваних зразків
Інкубація	30 хв при 37 °С на шейкері (500 об/хв) або 1 год при 37 °С, в термостаті
Промити	4 рази ФСБ-Т
Внести	В усі лунки по 100 мкл робочого розведення кон'югату
Інкубація	30 хв, 37, °С в термостаті
Промити	6 разів ФСБ-Т (звичайний промивний пристрій) або разів в режимі "overflow"
Внести	по 100 мкл розчину хромогену в кожну лунку
Інкубація	30 хв, 18-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в кожну лунку
Виміряти	ОГ при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - за повітрям