

Унитарное предприятие  
"Хозрасчетное опытное производство  
Института биоорганической химии  
Национальной академии наук Беларуси"  
Республика Беларусь  
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп. 3  
Факс (37517) 263-62-57

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАКТИВОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

**ИФА-ГЕП-С**  
Набор Т12-стрип

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра  
здравоохранения  
Республики Беларусь  
\_\_\_\_\_ А.С. Романенков  
"14" 04 2004 г.

### 1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор предназначен для первичного определения антител к вирусу гепатита С в сыворотке и плазме крови человека методом иммуноферментного анализа.

### 2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

#### 2.1 Состав набора:

- Концентрат раствора для промывания планшета (концентрат раствора №1)	3 фл. по 25 мл
- Иммуносорбент	2 планшета
- Раствор для разведения сывороток (раствор №3)	1 фл., 20 мл
- Раствор для разведения конъюгата (раствор №4)	1 фл., 26 мл
- Раствор для приготовления проявителя (раствор №5Т)	1 фл., 14 мл
- Конъюгат иммуноферментный	1 амп.; 0,6 мл
- Хромоген ТМБ	1 фл., 14 мл
- Положительная контрольная сыворотка (К <sup>+</sup> )	1 амп.; 0,6 мл
- Отрицательная контрольная сыворотка (К <sup>-</sup> )	1 амп.; 0,9 мл
- Стоп-реагент (2,0 моль/л H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 фл., 25 мл

2.2 Основные компоненты набора "ИФА-ГЕП-С" – иммуносорбент и иммуноферментный конъюгат.

Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, лунки которого сенсibilизированы рекомбинантными полипептидами – аналогами антигенов NS3, NS4 и Core вируса гепатита С.

Иммуноферментный конъюгат представляет собой моноклональные антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

При внесении в лунки планшета образцов исследуемых сывороток антитела, специфические к вирусу гепатита С, связываются с антигенами на твердой фазе, образуя иммунные комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы выявляют при помощи специфического иммуноферментного конъюгата. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки планшета добавляют раствор субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ).

Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (2М раствор серной кислоты), и интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм.

Величина ОП прямо пропорциональна концентрации специфических антител в образце сыворотки или плазмы. Чем выше содержание антител в образце сыворотки, тем выше интенсивность окрашивания.

2.3 Набор рассчитан на проведение 192 анализов (включая контроли).

### 3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 Присутствие в наборе "ИФА-ГЕП-С" некоторых биологических компонентов, источником которых является человек (положительная и отрицательная сыворотки), химикатов, а также работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), с отра-

ботанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты (согласно приказов МЗ РБ № 66 и № 351);
- не пипетировать растворы ртом;
- все жидкие отходы необходимо обрабатывать раствором с массовой долей перекиси водорода 6% при комнатной температуре в течение 3 ч;
- все твердые отходы необходимо собирать в специальный контейнер и затем автоклавировать в течение 1 ч при температуре 120 °С;
- инструменты и оборудование, а также рабочие поверхности, на которых проводился анализ, необходимо до и после работы протирать в течение нескольких секунд раствором с объемной долей этилового спирта 70° либо другими синтетическими средствами вируцидного действия.

### 4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток (плазмы), содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток или плазмы хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже -20 °С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

Необходимо помнить, что образцы с азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания не пригодны для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо постоянно проверять точность дозирования и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

### 5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- 5.1 Фотометр для измерения оптической плотности;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,02 до 1,000 мл (от 20 до 1000 мкл);
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл (от 50 до 300 мкл);
- суховоздушный термостат на 37 °С;
- мерные цилиндры вместимостью 20 и 1000 мл;
- стакан мерный вместимостью 1000 мл;
- ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
- клейкая пленка или крышка;
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор с объемной долей этилового спирта 70%;
- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

### 6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

(из расчета на 16 лунок)

6.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при комнатной температуре (18-22) °С в течение 30 мин.

6.2 Приготовление раствора № 1 для промывания планшета. Содержимое одного флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. Отобрать 6 мл концен-

траты в мерный стакан или цилиндр, добавить 270 мл дистиллированной воды и перемешать раствор.

Если концентрат раствора №1 содержит кристаллы, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (35-37) °С до полного растворения кристаллов.

Раствор № 1 для промывания планшета можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 сут.

**6.3** Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении В чистый флакон отобрать 2 мл раствора № 4, внести 0,04 мл (40 мкл) конъюгата иммуноферментного. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

**ВНИМАНИЕ!** Раствор конъюгата в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит.

#### **6.4** Приготовление раствора проявителя

В чистый флакон (с крышкой) отобрать 1 мл хромогена ТМБ, добавить 1 мл раствора № 5Т, смесь интенсивно перемешать в течение (30-40) с.

**ВНИМАНИЕ!** Раствор проявителя готовят непосредственно перед использованием в защищенном от света месте! Раствор хранению не подлежит!

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с раствором ТМБ, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники.

## **7 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА**

**7.1** Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический или полуавтоматический промыватель – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них; лунки должны заполняться до краев (0,2-0,3 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- необходимо выдерживать лунки заполненными раствором для отмывания планшетов не менее 30 с;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

## **8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

**8.1** Перед началом работы освободить необходимое количество стрипов от упаковочного пакета, вставить их в рамку. Стрипы, которые не используются в данной постановке, можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2-8) °С в течение одного месяца.

**8.2** Стрипы 1 раз промыть раствором № 1 для промывания планшета (п. 6.2.) с экспозицией раствора в лунках планшета в течение (40-60) с, удалить раствор с помощью промывателя или 8-канальной пипетки, удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

**8.3** Во все лунки стрипов внести по 0,08 мл (80 мкл) раствора № 3. При учете результатов анализа в одноволновом режиме оставить одну лунку пустой (бланк).

**8.4** В лунки А-1, В-1 внести по 0,02 мл (20 мкл) (K<sup>+</sup>). В лунки С-1, D-1, E-1 внести по 0,02 мл (20 мкл) (K). В остальные лунки стрипов внести по 0,02 мл (20 мкл) образцов исследуемых сывороток, осторожно перемешивая раствор в лунках пипетированием, при этом происходит изменение цвета раствора в лунках, содержащих образцы.

Стрипы заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 60 мин.

**8.5** Удалить раствор сывороток из лунок с помощью промывателя или 8-канальной пипетки, затем стрипы 4 раз промыть раствором № 1 для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п. 8.2.).

**8.6** Во все лунки стрипов внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора конъюгата (п. 6.3.). Стрипы заклеить новым листом пленки или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 30 мин.

**8.7** Удалить раствор конъюгата из лунок стрипов с помощью промывателя или 8-канальной пипетки, затем стрипы 6 раз промыть раствором № 1 для промывания планшета, удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п. 8.2.).

**8.8** В каждую лунку стрипов внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора проявителя (п.6.4.). Стрипы заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при температуре (18-22) °С в темном месте в течение 30 мин.

**8.9** Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента. Не позже чем через 1 мин после остановки цветной реакции определить оптическую плотность (ОП) в лунках в двухволновом режиме при длине волны 450 нм относительно 620 нм.

Возможно измерение ОП в одноволновом режиме: при длине волны 450 нм относительно пустой лунки (бланк). При работе в

одноволновом режиме снижается чувствительность и точность анализа.

## **9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА**

**9.1** Рассчитать среднее значение ОП для лунок с (K<sup>-</sup>) - ОП<sub>ср</sub> (K<sup>-</sup>) и для лунок с (K<sup>+</sup>) - ОП<sub>ср</sub> (K<sup>+</sup>).

**9.2** Результаты учитывают только при соблюдении следующих условий:

ОП<sub>ср</sub> (K<sup>-</sup>) не должно превышать 0,1 ОЕ;

ОП<sub>ср</sub> (K<sup>+</sup>) должно быть не ниже 0,6 ОЕ.

Если одно из трех значений ОП (K<sup>-</sup>) больше 0,1 ОЕ или более чем в два раза превышает ОП<sub>ср</sub> (K<sup>-</sup>), его отбрасывают и ОП<sub>ср</sub> (K<sup>-</sup>) рассчитывают по оставшимся значениям ОП (K<sup>-</sup>).

**9.3** Расчет параметров граничного значения ОП (ГЗ) и "серой зоны".

При соблюдении выше перечисленных условий вычислить ГЗ по формуле (1):

$$\text{ГЗ} = \text{ОП}_{\text{ср}} (\text{K}^-) + 0,06 \quad (1),$$

"Серая зона" – зона значений ОП, находящаяся в промежутке от ГЗ до значений меньших ГЗ на 10%.

**9.4** Образец считается положительным, если значение ОП данного образца выше ГЗ.

Образец считается отрицательным, если значение ОП данного образца меньше нижнего уровня ОП "серой зоны".

**9.5** Образцы, давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать повторно не менее, чем в двух лунках набора: образцы положительные в одной и более лунках, следует считать положительными; образцы отрицательные в двух и более лунках, следует считать отрицательными.

**9.6** Все образцы, которые при повторном анализе проявили себя как положительные, должны быть проверены подтверждающими методами.

## **10 ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА**

**10.1** Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

набор Т2-монолит – монолитный планшет, хромоген – раствор ТМБ. Набор рассчитан на проведение 2 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);

набор Т12-стрип – стриповый планшет, хромоген – раствор ТМБ. Набор рассчитан на проведение 12 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок).

## **11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА**

**11.1** Хранение набора должно производиться в чистом, сухом и темном помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Замораживать набор запрещается.

**11.2** Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования.

**11.3** Для получения надежных результатов необходимо строго соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

**11.4** Срок годности набора – 1 год.