



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 РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ИФА-ГЕП-С Набор Т12-стрип

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
21.01.2009 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор предназначен для выявления антител класса IgG к белкам вируса 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 (КРП)	3 фл. по 25 мл
- Иммуносорбент	2 планшета
- Раствор для разведения сывороток (РРС)	1 фл., 20 мл
- Раствор для разведения конъюгата (РПК)	1 фл., 26 мл
- Субстратный буферный раствор (СБР)	1 фл., 14 мл
- Конъюгат	1 мкпр.; 0,6 мл
- Хромоген ТМБ (ТМБ)	1 фл., 14 мл
- Положительная контрольная сыворотка (К ⁺)	1 мкпр.; 0,6 мл
- Отрицательная контрольная сыворотка (К ⁻)	1 мкпр.; 0,9 мл
- Стоп-реагент	1 фл., 25 мл

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

Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, в лунках которого сорбированы рекомбинантные белки NS3 и мозаичный белок NS34ab – аналоги антигенов вируса гепатита С (NS3, NS4 и Core).

Конъюгат представляет собой моноклональные антитела к иммуноглобулинам класса IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

При внесении в лунки планшета образцов исследуемых сывороток антитела, специфические к вирусу гепатита С, связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя иммунные комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы выявляют при помощи конъюгата. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки планшета добавляют раствор проявителя.

Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,5 М раствор серной кислоты), измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках (при длине волны 450 нм), которая пропорциональна концентрации HCV-специфических антител в образцах сывороток или плазмы крови.

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

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями приказов МЗ РБ № 66 и № 351. В

случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями ОСТ 42-21-2-85.

3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.5 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

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 дозировки 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 настроенный на температуру 37 °С;
 - мерные цилиндры вместимостью 20 и 1000 мл;
 - стакан стеклянный вместимостью 1000 мл;
 - ванночки для реагентов;
 - флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
 - клейкая пленка или крышка;
 - бумага фильтровальная;
 - перчатки резиновые хирургические;
 - 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 (18-25) °С в течение 30 мин.

6.2 Приготовление промывочного раствора.

6.2.1 Если КРП содержит осадок в виде кристаллов, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (35-37) °С до полного растворения кристаллов.

6.2.2 Содержимое одного флакона с КРП интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. Отобрать 6,0 мл концентрата в стакан вместимостью 1000 мл, добавить 270 мл дистиллированной воды и перемешать раствор.

Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 сут.

6.3 Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении.

В чистый флакон вместимостью 20 мл отобрать 2,0 мл РПК, внести 0,04 мл (40 мкл) конъюгата. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

ВНИМАНИЕ! Раствор готовят непосредственно перед использованием!

6.4 Приготовление раствора проявителя.

В чистый флакон вместимостью 20 мл внести 1,0 мл хромогена ТМБ и добавить 1,0 мл СБР, закрыть флакон крышкой и тщательно перемешать смесь в течение (30-40) с.

ВНИМАНИЕ! Раствор проявителя готовят непосредственно перед использованием!

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным.

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 (0,3 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- выдержать лунки с промывочным раствором в течение 30 с;

- удалить раствор из лунок.

По окончании промывания планшета удалить остатки влаги, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

Некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Перед началом работы иммуносорбент освободить от упаковочного пакета.

8.2 Планшет один раз промыть промывочным раствором, приготовленным по п. 6.2. Удалить остатки влаги, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3 В каждую лунку планшета внести по 0,08 мл (80 мкл) РРС.

8.4 В лунки планшета внести по 0,02 мл (20 мкл) образцов исследуемых сывороток, оставив свободными пять лунок первого ряда.

8.5 В две лунки (А-1, В-1) внести по 0,02 мл (20 мкл) (K^+), а в три оставшиеся лунки (С-1, D-1, E-1) внести по 0,02 мл (20 мкл) (K^-).

ВНИМАНИЕ! При внесении контрольных и исследуемых сывороток необходимо осторожно пипетировать смесь в лунках, при этом происходит изменение цвета раствора в лунках, содержащих образцы.

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

8.7 После окончания инкубации удалить содержимое лунок с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки, затем планшет четыре раза промыть промывочным раствором, приготовленным по п. 6.2 и после последней аспирации удалить остатки влаги, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.8 В каждую лунку планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора конъюгата в рабочем разведении, приготовленного по п. 6.3. Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 30 мин.

8.9 После окончания инкубации удалить раствор конъюгата из лунок планшета с помощью промывателя или 8-канальной пипетки, затем планшет шесть раз промыть промывочным раствором, приготовленным по п. 6.2. и удалить остатки влаги, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.10 В каждую лунку планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора проявителя, приготовленного по п.6.4. Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при температуре (18-25) °С в темном месте в течение 30 мин.

8.11 Остановить цветную реакцию путем внесения во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента. Не позже чем через 5 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 арифметическое значение ОП для лунок с (K^-) - ОП_{ср} (K^-) и для лунок с (K^+) - ОП_{ср} (K^+).

Значение ОП_{ср} (K^-) не должно быть выше 0,1 ОЕ, а значение ОП_{ср} (K^+) должно быть не ниже 0,6 ОЕ.

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

9.2.1 Значение ОП (ГЗ) рассчитывают, добавляя константную величину 0,12 к значению ОП_{ср} (K^-).

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

9.3 Результаты анализа считаются положительными, если значение ОП исследуемого образца больше ГЗ.

9.4 Результаты анализа считаются отрицательными, если значение ОП исследуемого образца меньше нижнего уровня ОП "серой зоны".

9.5 Образцы со значениями ОП в пределах "серой зоны" считаются неопределенными.

9.6 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.

9.7 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 Набор транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С.

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

Замораживать набор запрещается.

11.3 Срок годности набора – 12 месяцев.