УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
Здравоохранения
Республики Беларусь

_____ В.Е.Шевчук
"09" 04 2009г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ НАЛИЧИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С
В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ИФА-антиHCV-П
Комплект 1

СП ООО "Фармлэнд",
Генеральный директор

_____ В.В.Голынников
"20" 01 2009 г.

КОПИЯ ВЕРНА

2009

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для подтверждения наличия антител к различным антигенным детерминантам вируса гепатита С (core, NS3, NS4 и NS5) в сыворотке или плазме крови человека “in vitro” методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа, полученных при скрининге, и для идентификации стадии заболевания.

2 Характеристика и принцип работы набора

2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	1 планшет
Положительный контрольный образец ($К^+$)	1 флакон, 2 мл
Отрицательный контрольный образец ($К^-$)	1 флакон, 3 мл
Конъюгат (Кг)	1 флакон, 0,5 мл
Раствор для разведения конъюгата (РР-К)	1 флакон, 13 мл
Раствор конъюгата (РК) – ***вместо РР-К и Кг!***	1 флакон, 13 мл
Раствор для разведения сывороток (РР-С)	1 флакон, 13 мл
Буферный раствор для субстрата (БРС)	1 флакон, 13 мл
Хромоген ТМБ	1 флакон, 0,5 мл
Раствор хромогена (РХ) – ***вместо БРС и хромогена ТМБ!***	1 флакон, 13 мл
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25)	1 флакон, 28 мл
Стоп-реагент	1 флакон, 6 мл
Комплект ванночки для реагентов с наконечниками для многоканальных пипеток	2 комплекта
Клейкая пленка	3 штуки

2.2 Основные компоненты набора "ИФА-антиHCV-П" – иммуносорбент и конъюгат (раствор конъюгата).

Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, в лунках которого раздельно сорбированы рекомбинантные антигены и синтетические пептиды вируса гепатита С (ВГС), являющихся аналогами антигенов NS3, NS4, NS5 и Core: (“core” – стрипы, маркированные красной меткой; смесь “NS” (“NS3”, “NS4” и “NS5”), – стрипы, маркированные зеленой меткой:

а) антиген “core” представляет собой синтезированный в E. coli рекомбинантный антиген, содержащий аминокислотную последовательность антигенных детерминант корового (нуклеокапсидного) белка ВГС;

б) антиген “NS3” представляет собой синтезированный в E. coli рекомбинантный антиген, содержащий аминокислотную последовательность антигенных детерминант неструктурного белка NS3 ВГС;

в) антиген “NS4” представляет собой синтетический пептид, соответствующий антигенным детерминантам NS4 ВГС, характерный для генотипов 1в, 2в, 3а;

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

г) антиген "NS5" представляет собой синтезированный в E. coli рекомбинантный антиген, содержащий аминокислотную последовательность антигенных детерминант неструктурного белка NS5 ВГС.

Конъюгат (раствор конъюгата) представляет собой моноклональные антитела мыши к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Положительный контрольный образец – сыворотка крови человека, содержащая антитела к ВГС и не содержащая антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и HBs-антиген, инактивированная прогреванием в течение 3 ч при температуре 56 °С.

Отрицательный контрольный образец – сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВГС, ВИЧ-1, ВИЧ-2 и HBs-антиген, инактивированная прогреванием в течение 3 ч при температуре 56 °С.

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 ТМБ.

Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,9 М 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 крови человека. Чем выше содержание антител в образце сыворотки, тем выше интенсивность окрашивания.

2.3 Набор рассчитан на проведение **6 постановок** ИФА: 1 постановка – 2 стрип (16 лунок). Всего – **48 определений**, включая контрольные образцы.

3 Меры предосторожности при работе с набором

3.1 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции, с отработанными 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 и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2];
- в случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.2 Стоп-реагент, содержащий серную кислоту, обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и слизистые немедленно промыть большим количеством воды.

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

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.4 Все лица, занятые при производстве наборов, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

3.5 Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

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, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования в течение 15 мин при скорости вращения 3000 об/мин. Образцы сывороток можно хранить при температуре (2-8) °С до 48 ч. Замороженные образцы (желательно до температуры не менее минус 20 °С) можно хранить до 3 месяцев. Необходимо избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

Необходимо помнить, что образцы с 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;
- всю используемую для приготовления реагентов посуду не обрабатывать дезрастворами и моющими средствами. В случае необходимости промыть водой питьевой проточной, а затем пять раз ополоснуть дистиллированной водой;
- для работы с хромогеном ТМБ и РХ необходимо использовать отдельные емкости для растворов, наконечники для пипеток, посуду.
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- время между заполнением и опорожнением лунок планшета растворами и реагентами должно быть не менее 30 с. Не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- при использовании промывателя следить за состоянием емкости для раствора для промывания планшета и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста;
- необходимо использовать пипетки автоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать раствором с объемной долей спирта этилового 70 %. Не использовать хлорамин и другие хлорсодержащие вещества;
- для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами рекомендуется использовать одноразовые наконечники для пипеток. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

КОПИЯ ВЕРНА
07.03.19

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

5.1 Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- суховоздушный термостат типа ТС-80 М2, поддерживающий температуру (37±1) °С, или аналогичный ему по характеристикам;
- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,02 до 5,0 мл;
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости до 0,5 мл;
- мерный цилиндр вместимостью 1000 мл;
- колба лабораторная вместимостью 1000 мл;
- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
- ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор с объемной долей спирта этилового 70%;
- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода деионизированная или дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

Все образцы сывороток (плазмы) и реагенты перед проведением анализа тщательно перемешать.

Расход реагентов набора для постановки анализа, который определяется количеством используемых стрипов, приведен в таблице 1.

6.2 Подготовка иммуносорбента

Иммуносорбент готов к использованию.

Открыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре (2-8) °С в течение 3 месяцев.

6.3 Приготовление раствора для промывания планшета

Внимание! Раствор для промывания планшета готовить за 15 мин до начала проведения анализа!

Если флакон с ФСБ-Т×25 содержит осадок, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (37±1) °С до полного растворения осадка.

В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл внести содержимое флакона с ФСБ-Т×25, затем добавить дистиллированной воды до метки 700 мл и аккуратно перемешать раствор. Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 72 ч.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В случае использования одного или несколько стрипов содержимое флакона с ФСБ-Т×25 интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с, отобрать необходимый объем раствора (таблица 1) в мерный стакан или цилиндр, добавить необходимое количество дистиллированной воды и перемешать раствор.

Неиспользованный ФСБ-Т×25 можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

Таблица 1 – Расход реагентов набора для постановки ИФА

Объем реагента, мл	Количество используемых стрипов, шт.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление раствора для промывания планшета												
ФСБ-Т×25	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**	**12**	**14**	**16**	**18**	**20**	**22**	**28**
Дистиллиров. вода	**до 50**	**до 100**	**до 150**	**до 240**	**до 250**	**до 300**	**до 350**	**до 400**	**до 450**	**до 500**	**до 550**	**до 700**
Приготовление раствора Кг в рабочем разведении												
РР-К	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**13**
Кг	**a*/12**	**a*/6**	**a*/4**	**a*/3**	**5/12a***	**a*/2**	**7/12a***	**2/3a***	**3/4a***	**5/6a***	**11/12a***	**a***
Приготовление рабочего раствора субстрата												
БРС	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**13**
Хромоген ТМБ	**b*/12**	**b*/6**	**b*/4**	**b*/3**	**5/12b***	**b*/2**	**7/12b***	**2/3b***	**3/4b***	**5/6b***	**11/12b***	**b***

* a = X мл (величина переменная, определяется для каждой серии набора).
* b = X мл (величина переменная, определяется для каждой серии набора).

6.4 Подготовка K^+, K^-, РК, РР-К, РР-С, БРС, РХ и стоп-реагента

K^+, K^-, РК, РР-К, РР-С, БРС, РХ и стоп-реагент готовы к использованию.

Внимание! Во флаконах с РК, РР-С и РР-К возможно выпадение осадка. Перед использованием содержимое флаконов тщательно перемешать, не допуская образования пены.

Внимание! Необходимо исключить воздействие прямого солнечного света на флакон с РХ!

Неиспользованные РК, РР-С, РР-К, БРС, РХ и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

Остаток K^+ и K^- после вскрытия флакона можно хранить в закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

КОПИЯ ВЕРНА
дейст. по 07.03.19
Ценчук Ю.В. 20

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.5 Приготовление раствора Кг в рабочем разведении

Из флакона с Кг отобрать указанный в таблице 1 объем и перенести во флакон с РР-К. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов в **чистый** флакон отобрать необходимое количество РР-К, добавить Кг в соответствии с таблицей 1 и перемешать раствор, не допуская образования пены.

Внимание! Раствор Кг в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием! Раствор Кг в рабочем разведении можно хранить в течение 15 мин при температуре (18-25) °С. Использовать только новую ванночку для реагентов и новые наконечники!

Остаток Кг можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.6 Приготовление рабочего раствора субстрата

Если флакон с хромогеном ТМБ содержит кристаллы, его необходимо прогреть перед использованием в течении (3-5) мин при температуре (37±1) °С до полного растворения кристаллов.

Из флакона с хромогеном ТМБ отобрать указанный в таблице 1 объем и перенести во флакон с БРС. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов в **чистый** флакон из темного стекла или пластика (прозрачный флакон обернуть флакон) отобрать необходимое количество БРС, добавить хромоген ТМБ в соответствии с таблицей 1 и перемешать раствор, не допуская образования пены.

Внимание! Рабочий раствор субстрата готовят непосредственно перед использованием в защищенном от света месте! Раствор можно хранить в течение 20 мин при температуре (18-25) °С в защищенном от света месте.

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

Остаток хромогена ТМБ можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

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;
- необходимо при каждом промывании все лунки заполнить раствором до краев (0,30-0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

Республика Беларусь Белорусско-голландское совместное предприятие с ограниченной ответственностью «ФАРМПЛАНТ» Для документов г. Несвиж

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- необходимо выдерживать лунки, заполненными раствором для промывания планшета, в течение 30 с;

- при каждой аспирации тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием рамкой со стрипами в перевернутом положении по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 Проведение анализа

8.1 Промыть лунки планшета раствором для промывания планшета (п 6.3) **один раз.** При промывании во все лунки необходимо внести (0,30-0,35) мл раствора. По окончании промывания тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена.

8.2 В лунки планшета A-1, A-2, B-1 и B-2 внести по 0,1 мл (100 мкл) $К^+$; в лунки C-1, C-2, D-1, D-2, E-1 и E-2 внести по 0,1 мл (100 мкл) $К^-$; в лунки F-1 и F-2, внести по 0,1 мл (100 мкл) РР-С для контроля конъюгата (ККг).

Внимание! При постановке ИФА на двух стрипах допускается использовать для $К^-$ – четыре лунки (по две для каждого стрипа), для $К^+$ – две лунки (по одной для каждого стрипа), для ККг – две лунки (по одной для каждого стрипа).

В остальные лунки планшета внести по 0,08 мл (80 мкл) РР-С, затем внести по 0,02 мл (20 мкл) исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови человека в соответствии с рисунком 1. Содержимое лунок перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РР-С должен измениться.

Внимание! Время внесения контрольных и исследуемых образцов не должно превышать (5-10) мин! Каждый образец необходимо отбирать одноразовым наконечником!

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$К^+$	$К^+$	№3	№3	№11	№11	№19	№19	№27	№27	№35	№35
B	$К^+$	$К^+$	№4	№4	№12	№12	№20	№20	№28	№28	№36	№36
C	$К^-$	$К^-$	№5	№5	№13	№13	№21	№21	№29	№29	№37	№37
D	$К^-$	$К^-$	№6	№6	№14	№14	№22	№22	№30	№30	№38	№38
E	$К^-$	$К^-$	№7	№7	№15	№15	№23	№23	№31	№31	№39	№39
F	Кг	Кг	№8	№8	№16	№16	№24	№24	№32	№32	№40	№40
G	№1	№1	№9	№9	№17	№17	№25	№25	№33	№33	№41	№41
H	№2	№2	№10	№10	№18	№18	№26	№26	№34	№34	№42	№42
	core	**NS**	**core**	**NS**	**core**	**NS**	**core**	**NS**	**core**	**NS**	**core**	**NS**

Рисунок 1 – Схема внесения образцов в лунки планшета

Внимание! Стрипы иммуносорбента 1, 3, 5, 7, 9, 11, в лунках которых сорбирован рекомбинантный антиген core, кодируемый структурной областью генома ВГС, маркированы красным цветом. Стрипы иммуносорбента 2, 4, 6, 8, 10, 12, в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

лунках которых сорбирована смесь рекомбинантных антигенов NS3, NS5 и синтетического пептида NS4, кодируемых неструктурными областями генома ВГС, маркированы зеленым цветом.

8.3 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С в течение 30 мин.**

Внимание! За (1-2) мин до окончания инкубации приготовить раствор Кг в рабочем разведении (п 6.5).

8.4 Удалить содержимое лунок с помощью промывателя, затем промыть лунки планшета раствором для промывания планшета (п 6.3) **пять раз.**

8.5 Внести во все лунки планшета по 0,1 мл (100 мкл) раствора РК или раствора Кг в рабочем разведении (п 6.5) в зависимости от комплектации набора.

8.6 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С в течение 30 мин.**

8.7 Удалить содержимое лунок планшета с помощью промывателя, затем промыть лунки планшетов раствором для промывания планшета (п 6.3) **пять раз.**

8.8 Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) рабочего раствора субстрата (п 6.6) или РХ в зависимости от комплектации набора.

8.9 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С в защищенном от света месте в течение 15 мин.**

Внимание! По окончании инкубации в лунках с образцами сывороток, содержащими антитела к ВГС, произойдет изменение окраски раствора различной интенсивности в зависимости от концентрации антител в исследуемом образце сыворотки: от бесцветной до голубой (при использовании рабочего раствора субстрата) или от розовой до синей (при использовании РХ).

8.10 Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 0,05 мл (50 мкл) стоп-реагента.

Внимание! В лунках с образцами сывороток, содержащими антитела к ВГС, произойдет изменение окраски раствора: с голубой на желтую (при использовании рабочего раствора субстрата) или с синей на желтую (при использовании РХ).

8.11 Не позже чем через 40 мин после остановки реакции определить значение ОП раствора в лунках:

- при использовании РХ – в двухволновом режиме: **450 нм** относительно **(620-700) нм.** Допускается измерение ОП в одноволновом режиме при длине волны 450 нм.

- при использовании рабочего раствора субстрата – в одноволновом режиме при длине волны 450 нм.

9 Обработка результатов анализа

9.1 Рассчитать отдельно для стрипов среднее значение ОП для лунок с $К^-$ – ОПср $К^-$, ОЕ; для лунок с $К^+$ – ОПср $К^+$, ОЕ.

9.2 Результаты учитывать только в том случае если:

- значение ОПср $К^-$ – не более 0,20 ОЕ;
- значение ОПср $К^+$ – не менее 1,00 ОЕ;
- значение ОП в лунке с ККг – не более 0,15 ОЕ;

Республика Беларусь Русско-голландское совместное предприятие Общество с ограниченной ответственностью «ФАРМЛЭНД» Для документов г. Несвиж

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.3 При соблюдении выше перечисленных условий вычислить отдельно для стрипов критическое значение (ОПкрит.core и ОПкрит.NS), ОЕ, по формулам (1; 2):

$$ОПкрит.core = ОПср К^{-}core + \mathbf{0,2} \quad (1).$$

$$ОПкрит.NS = ОПср К^{-}NS + \mathbf{0,2} \quad (2).$$

Результат теста считать **положительным** при анализе на данном наборе реагентов, если значение ОПcore, значение ОПNS исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови человека или хотя бы одно из них **равно или больше** значения **ОПкрит.**

Результат теста считать **отрицательным** при анализе на данном наборе реагентов, если значение ОПcore, значение ОПNS исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови человека **меньше** значения **ОПкрит.**

При получении положительного результата этот же образец сыворотки исследовать повторно. При повторном получении положительного результата исследовать новую порцию сыворотки (плазмы) крови от того же человека. Желательно, чтобы повторно взятый образец сыворотки крови (плазмы) был проанализирован с предыдущим образцом («парные сыворотки»). Если и в этом случае будет получен положительный результат, сыворотку передать для дальнейшего изучения другими методами.

10 Форма выпуска набора

10.1 Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

1 **комплект 1** – проведение анализа ручным способом. Набор рассчитан на проведение **6 постановок** ИФА на **разборном** планшете: 1 постановка – 2 стрипа (16 лунок). Всего – **48 определений**, включая контрольные образцы;

2 комплект 2 – проведение анализа ручным способом. Набор рассчитан на проведение 3 постановок ИФА на разборном планшете: 1 постановка – 4 стрипа (32 лунки). Всего – 24 определения, включая контрольные образцы;

11 Условия хранения и применения набора

11.1 Хранение набора должно производиться в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Запрещается замораживать компоненты набора.

11.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11.3 Срок годности набора – 12 месяцев.

Библиография

[1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь

«ФАРМЛЭНД» Для документов

КОПИЯ ВЕРНА
докум. № 6/н от 07.03.19
Сенькут Ю.В. 20 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

[2] Приказ №351 от 16.12.98г.
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
[3] ОСТ 42-21-2-85
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы
[4] Постановление № 33 Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08.08.2000 г.
О порядке проведения обязательных медицинских осмотров работников
[5] Санитарные нормы и правила
СанПиН № 2.1.7.14-20-2005 Правила обращения с медицинскими отходами

Инструкция составлена
сотрудниками СП ООО «Фармлэнд»:

Главным специалистом
СП ООО «Фармлэнд» Ю.В.Сенчук

Ведущим-технологом Е.И.Лаврецкой

Ведущим специалистом по
диагностическим тест-системам И.М.Богдановской

Республика Беларусь
Белорусско-голландское совместное предприятие
общество с ограниченной ответственностью
«ФАРМЛЭНД»
Для документов
г. Несвиж

КОПИЯ ВЕРНА
«Сенчук» 2020 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
Здравоохранения
Республики Беларусь

_____ В.Е.Шевчук
"09" 01 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ НАЛИЧИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ИФА-антиHCV-П
Комплект 2

СП ООО "Фармлэнд"
Генеральный директор

_____ В.В.Голынников
"20" 01 2009 г.

КОПИЯ ВЕРНА
«___» _____ 20___ г.

2009

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для подтверждения наличия антител к различным антигенным детерминантам вируса гепатита С (core, NS3, NS4 и NS5) в сыворотке или плазме крови человека “in vitro” методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа, полученных при скрининге, и для идентификации стадии заболевания.

2 Характеристика и принцип работы набора

2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	1 планшет
Положительный контрольный образец ($К^+$)	1 флакон, 3 мл
Отрицательный контрольный образец ($К^-$)	1 флакон, 3 мл
Конъюгат (Кг)	1 флакон, 0,5 мл
Раствор для разведения конъюгата (РР-К)	1 флакон, 13 мл
Раствор конъюгата (РК) – ***вместо РР-К и Кг!***	1 флакон, 13 мл
Раствор для разведения сывороток (РР-С)	1 флакон, 13 мл
Буферный раствор для субстрата (БРС)	1 флакон, 13 мл
Хромоген ТМБ	1 флакон, 0,5 мл
Раствор хромогена (РХ) – ***вместо БРС и хромогена ТМБ!***	1 флакон, 13 мл
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25)	1 флакон, 28 мл
Стоп-реагент	1 флакон, 6 мл
Комплект ванночки для реагентов с наконечниками для многоканальных пипеток	2 комплекта
Клейкая пленка	3 штуки

2.2 Основные компоненты набора "ИФА-антиHCV-П" – иммуносорбент и конъюгат (раствор конъюгата).

Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, в лунках которого раздельно сорбированы рекомбинантные антигены и синтетические пептиды вируса гепатита С (ВГС), являющихся аналогами антигенов NS3, NS4, NS5 и Core: (“core” – стрипы, маркированные красной меткой; “NS3” – стрипы, маркированные зеленой меткой; “NS4” – стрипы, маркированные синей меткой и “NS5” – стрипы, маркированные черной меткой:

а) антиген “core” представляет собой синтезированный в E. coli рекомбинантный антиген, содержащий аминокислотную последовательность антигенных детерминант корового (нуклеокапсидного) белка ВГС;

б) антиген “NS3” представляет собой синтезированный в E. coli рекомбинантный антиген, содержащий аминокислотную последовательность антигенных детерминант неструктурного белка NS3 ВГС;

в) антиген “NS4” представляет собой синтетический пептид, соответствующий антигенным детерминантам NS4 ВГС, характерный для генотипов 1в, 2в, 3а;

«ФАРМЛЭНД» Для документов
ОБРАЗЕЦ
«___» _____ 20___ г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

г) антиген "NS5" представляет собой синтезированный в E. coli рекомбинантный антиген, содержащий аминокислотную последовательность антигенных детерминант неструктурного белка NS5 ВГС.

Конъюгат (раствор конъюгата) представляет собой моноклональные антитела мыши к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Положительный контрольный образец – сыворотка крови человека, содержащая антитела к ВГС и не содержащая антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и HBs-антиген, инактивированная прогреванием в течение 3 ч при температуре 56 °С.

Отрицательный контрольный образец – сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВГС, ВИЧ-1, ВИЧ-2 и HBs-антиген, инактивированная прогреванием в течение 3 ч при температуре 56 °С.

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 ТМБ.

Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,9 М 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 крови человека. Чем выше содержание антител в образце сыворотки, тем выше интенсивность окрашивания.

2.3 Набор рассчитан на проведение **3 постановок** ИФА: 1 постановка – 4 стрипа (32 лунки). Всего – **24 определения**, включая контрольные образцы.

3 Меры предосторожности при работе с набором

3.1 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции, с отработанными 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 и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2];
- в случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.2 Стоп-реагент, содержащий серную кислоту, обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и слизистые немедленно промыть большим количеством воды.

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

КОПИЯ ВЕРНА
«____» _____ 20___ г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.4 Все лица, занятые при производстве наборов, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

3.5 Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

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, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования в течение 15 мин при скорости вращения 3000 об/мин. Образцы сывороток можно хранить при температуре (2-8) °С до 48 ч. Замороженные образцы (желательно до температуры не менее минус 20 °С) можно хранить до 3 месяцев. Необходимо избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

Необходимо помнить, что образцы с 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;
- всю используемую для приготовления реагентов посуду не обрабатывать дезрастворами и моющими средствами. В случае необходимости промыть водой питьевой проточной, а затем пять раз ополоснуть дистиллированной водой;
- для работы с хромогеном ТМБ и РХ необходимо использовать отдельные емкости для растворов, наконечники для пипеток, посуду.
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- время между заполнением и опорожнением лунок планшета растворами и реагентами должно быть не менее 30 с. Не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- при использовании промывателя следить за состоянием емкости для раствора для промывания планшета и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста;
- необходимо использовать пипетки автоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать раствором с объемной долей спирта этилового 70 %. Не использовать хлорамин и другие хлорсодержащие вещества;
- для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами рекомендуется использовать одноразовые наконечники для пипеток. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

КОПИЯ ВЕРНА
«___» _____ 20___ г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

5.1 Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- суховоздушный термостат типа ТС-80 М2, поддерживающий температуру (37±1) °С, или аналогичный ему по характеристикам;
- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,02 до 5,0 мл;
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости до 0,5 мл;
- мерный цилиндр вместимостью 1000 мл;
- колба лабораторная вместимостью 1000 мл;
- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
- ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор с объемной долей спирта этилового 70%;
- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода деионизированная или дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

Все образцы сывороток (плазмы) и реагенты перед проведением анализа тщательно перемешать.

Расход реагентов набора для постановки анализа, который определяется количеством используемых стрипов, приведен в таблице 1.

6.2 Подготовка иммуносорбента

Иммуносорбент готов к использованию.

Открыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре (2-8) °С в течение 3 месяцев.

6.3 Приготовление раствора для промывания планшета

Внимание! Раствор для промывания планшета готовить за 15 мин до начала проведения анализа!

Если флакон с ФСБ-Т×25 содержит осадок, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (37±1) °С до полного растворения осадка.

В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл внести содержимое флакона с ФСБ-Т×25, затем добавить дистиллированной воды до метки 700 мл и аккуратно перемешать раствор. Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 72 ч.

«ФАРМЛЭНД» Для документов
КОПИЯ ВЕРНА
«____» _____ 20____ г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В случае использования одного или несколько стрипов содержимое флакона с ФСБ-Т×25 интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с, отобрать необходимый объем раствора (таблица 1) в мерный стакан или цилиндр, добавить необходимое количество дистиллированной воды и перемешать раствор.

Неиспользованный ФСБ-Т×25 можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

Таблица 1 – Расход реагентов набора для постановки ИФА

Объем реагента, мл	Количество используемых стрипов, шт.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Приготовление раствора для промывания планшета												
ФСБ-Т×25	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**	**12**	**14**	**16**	**18**	**20**	**22**	**28**
Дистиллиров. вода	**до 50**	**до 100**	**до 150**	**до 240**	**до 250**	**до 300**	**до 350**	**до 400**	**до 450**	**до 500**	**до 550**	**до 700**
Приготовление раствора Кг в рабочем разведении												
РР-К	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**13**
Кг	**a*/12**	**a*/6**	**a*/4**	**a*/3**	**5/12a***	**a*/2**	**7/12a***	**2/3a***	**3/4a***	**5/6a***	**11/12a***	**a***
Приготовление рабочего раствора субстрата												
БРС	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**13**
Хромоген ТМБ	**b*/12**	**b*/6**	**b*/4**	**b*/3**	**5/12b***	**b*/2**	**7/12b***	**2/3b***	**3/4b***	**5/6b***	**11/12b***	**b***

* a = X мл (величина переменная, определяется для каждой серии набора).
* b = X мл (величина переменная, определяется для каждой серии набора).

6.4 Подготовка K^+, K^-, РК, РР-К, РР-С, БРС, РХ и стоп-реагента

K^+, K^-, РК, РР-К, РР-С, БРС, РХ и стоп-реагент готовы к использованию.

Внимание! Во флаконах с РК, РР-С и РР-К возможно выпадение осадка. Перед использованием содержимое флаконов тщательно перемешать, не допуская образования пены.

Внимание! Необходимо исключить воздействие прямого солнечного света на флакон с РХ!

Неиспользованные РК, РР-С, РР-К, БРС, РХ и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

Остаток K^+ и K^- после вскрытия флакона можно хранить в закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

КОПИЯ ВЕРНА
«____» _____ 20___ г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.5 Приготовление раствора Кг в рабочем разведении

Из флакона с Кг отобрать указанный в таблице 1 объем и перенести во флакон с РР-К. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов в **чистый** флакон отобрать необходимое количество РР-К, добавить Кг в соответствии с таблицей 1 и перемешать раствор, не допуская образования пены.

Внимание! Раствор Кг в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием! Раствор Кг в рабочем разведении можно хранить в течение 15 мин при температуре (18-25) °С. Использовать только новую ванночку для реагентов и новые наконечники!

Остаток Кг можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.6 Приготовление рабочего раствора субстрата

Если флакон с хромогеном ТМБ содержит кристаллы, его необходимо прогреть перед использованием в течении (3-5) мин при температуре (37±1) °С до полного растворения кристаллов.

Из флакона с хромогеном ТМБ отобрать указанный в таблице 1 объем и перенести во флакон с БРС. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов в **чистый** флакон из темного стекла или пластика (прозрачный флакон обернуть флакон) отобрать необходимое количество БРС, добавить хромоген ТМБ в соответствии с таблицей 1 и перемешать раствор, не допуская образования пены.

Внимание! Рабочий раствор субстрата готовят непосредственно перед использованием в защищенном от света месте! Раствор можно хранить в течение 20 мин при температуре (18-25) °С в защищенном от света месте.

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

Остаток хромогена ТМБ можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

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;
- необходимо при каждом промывании все лунки заполнить раствором до краев (0,30-0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

КОПИЯ ВЕРНА

«___» _____ 20___ г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- необходимо выдерживать лунки, заполненными раствором для промывания планшета, в течение 30 с;

- при каждой аспирации тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием рамкой со стрипами в перевернутом положении по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 Проведение анализа

8.1 Промыть лунки планшета раствором для промывания планшета (п 6.3) **один раз.** При промывании во все лунки необходимо внести (0,30-0,35) мл раствора. По окончании промывания тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена.

8.2 В лунки планшета A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, B-2, B-3 и B-4, внести по 0,1 мл (100 мкл) $К^+$; в лунки C-1, C-2, C-3, C-4, D-1, D-2, D-3, D-4, E-1, E-2, E-3 и E-4 внести по 0,1 мл (100 мкл) $К^-$; в лунки F-1, F-2, F-3 и F-4 внести по 0,1 мл (100 мкл) РР-С для контроля конъюгата (ККг).

Внимание! При постановке ИФА на четырех стрипах допускается использовать для $К^-$ – восемь лунок (по две для каждого стрипа), для $К^+$ – четыре лунки (по одной для каждого стрипа), для ККг – четыре лунки (по одной для каждого стрипа).

В остальные лунки планшета внести по 0,08 мл (80 мкл) РР-С, затем внести по 0,02 мл (20 мкл) исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови человека в соответствии с рисунком 1. Содержимое лунок перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет РР-С должен измениться.

Внимание! Время внесения контрольных и исследуемых образцов не должно превышать (5-10) мин! Каждый образец необходимо отбирать одноразовым наконечником!

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$К^+$	$К^+$	$К^+$	$К^+$	№3	№3	№3	№3	№11	№11	№11	№11
B	$К^+$	$К^+$	$К^+$	$К^+$	№4	№4	№4	№4	№12	№12	№12	№12
C	$К^-$	$К^-$	$К^-$	$К^-$	№5	№5	№5	№5	№13	№13	№13	№13
D	$К^-$	$К^-$	$К^-$	$К^-$	№6	№6	№6	№6	№14	№14	№14	№14
E	$К^-$	$К^-$	$К^-$	$К^-$	№7	№7	№7	№7	№15	№15	№15	№15
F	Кг	Кг	Кг	Кг	№8	№8	№8	№8	№16	№16	№16	№16
G	№1	№1	№1	№1	№9	№9	№9	№9	№17	№17	№17	№17
H	№2	№2	№2	№2	№10	№10	№10	№10	№18	№18	№18	№18
	core	**NS3**	**NS4**	**NS5**	**core**	**NS3**	**NS4**	**NS5**	**core**	**NS3**	**NS4**	**NS5**

Рисунок 1 – Схема внесения образцов в лунки планшета

Внимание! Стрипы иммуносорбента 1, 5, 9, в лунках которых сорбирован рекомбинантный антиген core, кодируемый структурной областью генома ВГС, мар-

КОПИЯ ВЕРНА
«___» _____ 20___ г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

кированы красным цветом. Стрипы иммуносорбента 2, 6, 10, в лунках которых сорбирован рекомбинантный антиген NS3, кодируемый неструктурными областями генома ВГС, маркированы зеленым цветом. Стрипы иммуносорбента 3, 7, 11, в лунках которых сорбирован синтетический пептид NS4, кодируемый неструктурными областями генома ВГС, маркированы синим цветом. Стрипы иммуносорбента 4, 8, 12, в лунках которых сорбирован рекомбинантный антиген NS5, кодируемый неструктурными областями генома ВГС, маркированы черным цветом.

8.3 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С в течение 30 мин.**

Внимание! За (1-2) мин до окончания инкубации приготовить раствор Кг в рабочем разведении (п 6.5).

8.4 Удалить содержимое лунок с помощью промывателя, затем промыть лунки планшета раствором для промывания планшета (п 6.3) **пять раз.**

8.5 Внести во все лунки планшета по 0,1 мл (100 мкл) раствора РК или раствора Кг в рабочем разведении (п 6.5) в зависимости от комплектации набора.

8.6 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С в течение 30 мин.**

8.7 Удалить содержимое лунок планшета с помощью промывателя, затем промыть лунки планшетов раствором для промывания планшета (п 6.3) **пять раз.**

8.8 Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) рабочего раствора субстрата (п 6.6) или РХ в зависимости от комплектации набора.

8.9 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре **(37±1) °С в защищенном от света месте в течение 15 мин.**

Внимание! По окончании инкубации в лунках с образцами сывороток, содержащими антитела к ВГС, произойдет изменение окраски раствора различной интенсивности в зависимости от концентрации антител в исследуемом образце сыворотки: от бесцветной до голубой (при использовании рабочего раствора субстрата) или от розовой до синей (при использовании РХ).

8.10 Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 0,05 мл (50 мкл) стоп-реагента.

Внимание! В лунках с образцами сывороток, содержащими антитела к ВГС, произойдет изменение окраски раствора: с голубой на желтую (при использовании рабочего раствора субстрата) или с синей на желтую (при использовании РХ).

8.11 Не позже чем через 40 мин после остановки реакции определить значение ОП раствора в лунках:

- при использовании РХ – в двухволновом режиме: **450 нм** относительно **(620-700) нм.** Допускается измерение ОП в одноволновом режиме при длине волны 450 нм.

- при использовании рабочего раствора субстрата – в одноволновом режиме при длине волны 450 нм.

9 Обработка результатов анализа

9.1 Рассчитать отдельно для стрипов среднее значение ОП для лунок с $К^-$ – ОПср $К^-$, ОЕ; для лунок с $К^+$ – ОПср $К^+$, ОЕ.

КОПИЯ ВЕРНА
«____» _____ 20____ г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.2 Результаты учитывать только в том случае если:

- значение ОПср $К^-$ – не более 0,20 ОЕ;
- значение ОПср $К^+$ – не менее 1,00 ОЕ;
- значение ОП в лунке с ККг – не более 0,15 ОЕ;

9.3 При соблюдении выше перечисленных условий вычислить отдельно для стрипов критическое значение (ОПкрит.core; ОПкрит.NS3; ОПкрит.NS4 и ОПкрит.NS5), ОЕ, по формулам (1; 2; 3; 4):

$$ОПкрит.core = ОПср\ К^-core + \mathbf{0,2} \quad (1).$$

$$ОПкрит.NS3 = ОПср\ К^-NS3 + \mathbf{0,2} \quad (2).$$

$$ОПкрит.NS4 = ОПср\ К^-NS4 + \mathbf{0,2} \quad (3).$$

$$ОПкрит.NS5 = ОПср\ К^-NS5 + \mathbf{0,2} \quad (4).$$

Результат теста считать **положительным** при анализе исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови человека на данном наборе реагентов, если:

1) значение ОПcore **больше или равно** значения **ОПкрит.core**, либо

2) значения ОПNS для любых двух или более NS-антигенов **больше или равны** соответствующим значениям **ОПкрит**.

Если исследуемый образец сыворотки (плазмы) крови дает положительную реакцию на антитела только к одному из NS-антигенов, то необходимо исследовать новую порцию сыворотки (плазмы) крови от того же человека через (2-3) недели от момента первого отбора крови. Желательно, чтобы повторно взятый образец сыворотки крови (плазмы) был проанализирован с предыдущим образцом («парные сыворотки»).

Если и в этом случае будет получен аналогичный результат, считать реакцию на антитела отрицательной.

10 Форма выпуска набора

10.1 Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

1 комплект 1 – проведение анализа ручным способом. Набор рассчитан на проведение 6 постановок ИФА на разборном планшете: 1 постановка – 2 стрипа (16 лунок). Всего – 48 определений, включая контрольные образцы;

2 **комплект 2** – проведение анализа ручным способом. Набор рассчитан на проведение 3 постановок ИФА на **разборном** планшете: 1 постановка – 4 стрипа (32 лунки). Всего – **24 определения**, включая контрольные образцы;

11 Условия хранения и применения набора

11.1 Хранение набора должно производиться в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Запрещается замораживать компоненты набора.

КОПИЯ ВЕРНА
«___» _____ 20___ г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11.3 Срок годности набора – 12 месяцев.

Библиография

[1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь

[2] Приказ №351 от 16.12.98г.
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД

[3] ОСТ 42-21-2-85
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы

[4] Постановление № 33 Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08.08.2000 г.
О порядке проведения обязательных медицинских осмотров работников

[5] Санитарные нормы и правила
СанПиН № 2.1.7.14-20-2005 Правила обращения с медицинскими отходами

Инструкция составлена
сотрудниками СП ООО «Фармлэнд»:

Главным специалистом
СП ООО «Фармлэнд» Ю.В.Сенчук

Ведущим-технологом Е.И.Лаврецкой

Ведущим специалистом по
диагностическим тест-системам И.М.Богдановской

Республика Беларусь Белорусско-голландское совместное предприятие общество с ограниченной ответственностью «ФАРМЛЭНД» Для документов г. Несвиж

КОПИЯ ВЕРНА
«___» _____ 20___ г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru