

**ОПИСАНИЕ
ПОЛЕЗНОЙ
МОДЕЛИ К
ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **3779**

(13) **U**

(46) **2007.08.30**

(51) МПК (2006)

G 01N 33/00

C 12Q 1/00

(54)

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ
К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С**

(21) Номер заявки: u 20070001

(22) 2007.01.03

(71) Заявитель: Учреждение образования
"Гомельский государственный ме-
дицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Жаворонок Сергей Влади-
мирович; Рудницкая Алла Стефановна;
Воропаев Евгений Викторович; Мицу-
ра Виктор Михайлович; Аль-Шаби
Аль-Ханса Абдулрахман Анвар (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение обра-
зования "Гомельский государственный
медицинский университет" (ВУ)

(57)

1. Тест-система для определения антител к вирусу гепатита С включает герметично упакованные емкости с положительными образцами антител к вирусу гепатита С, соответствующих участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS3, NS4, NS5 областью генома вируса гепатита С и контрольными отрицательными образцами, **отличающаяся** тем, что емкости имеют вместимость 1000-1500 мкл, выполнены из небьющегося, непрозрачного материала, однократного применения, в качестве образцов служат сыворотки крови с наличием разных антител к антигенам, соответствующих участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS3, NS4, NS5 областью генома вируса гепатита С и их комбинаций вируса гепатита С, в качестве контрольного отрицательного образца выбран образец нормальной сыворотки крови, а также сильноположительный и слабоположительный образцы сыворотки крови по величине показателей оптической плотности выявляемых антител.

2. Тест-система для определения антител к вирусу гепатита С по п. 1, **отличающаяся** тем, что образцы сывороток крови с наличием разных антител к антигенам предлагаемой полезной модели представляют собой:

образец сыворотки крови сильно положительной, содержащей антитела к антигенам вирусу гепатита С, оптическая плотность образца сыворотки крови составляет значение от 2,5 единиц;

образец сыворотки крови слабоположительной, содержащей антитела к антигенам вирусу гепатита С, оптическая плотность образца сыворотки крови составляет значение от 0,4 единиц;

образец сыворотки крови с наличием антител к участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS3, т.е. - Core, NS3;

образец сыворотки крови с наличием антител к участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS4, т.е. - Core, NS4;

образец сыворотки крови с наличием антител к участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS5, т.е. - Core, NS5;

образец сыворотки крови с наличием антител к участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS4, NS5 - Core, NS4, NS5;

2 образца сыворотки крови отрицательной, то есть не содержащей антитела к вирусу гепатита С.

ВУ 3779 U 2007.08.30

ВУ 3779 U 2007.08.30

(56)

1. Инструкция по применению тест-системы иммуноферментной для выявления антител к вирусу гепатита С ("ВГС-контроль"): Утв.зам. Министра здравоохранения РБ: Срок действия установлен с 24.04.2003. - Мн., 2003 - 2 с, НПООО "ММС" РБ, ТУ РБ 14786139.008-98 изм. "1"

2. Инструкция диагностической иммуноферментной тест-системы "РекомбиБест анти-ВГС - стрип", ЗАО "Вектор-Бест". - Россия, п. Кольцово Новосибирской обл., Федеральная лицензия № 42/055/2001, 2003. - 13 с.

Полезная модель относится к медицине, а именно к вирусологии, биотехнологии и иммунологии, и может быть использована для контроля качества работы лабораторий, скрининга в группах риска, специфической диагностики вирусных гепатитов, подтверждения положительных результатов на антитела к вирусу гепатита.

Известна иммуноферментная тест-система "ВГС-контроль", выявляющая антитела класса IgG и IgM к антигенам вируса гепатита С в сыворотке или плазме крови методом иммуноферментного анализа [1].

Набор тест-системы рассчитан на проведение 96 анализов (с учетом контрольных) на присутствие анти-ВГС с возможностью дробного 6-ти разового использования его на протяжении срока годности тест-системы.

Тест-система включает:

иммуносорбент - пластиковый планшет с лунками на которые сорбированы рекомбинантные антигены вируса гепатита С (ВГС Ag), аналогичные структурным (core - Ag) и неструктурным (NS3 - Ag, NS4 - Ag и NS5-Ag) белкам вируса гепатита С;

конъюгат - смесь моноклональных антител мыши против иммуноглобулинов IgG и IgM человека с пероксидазой хрена (11-кратный концентрат);

положительный контрольный образец - K^+ - сыворотку крови человека, содержащую антитела к вирусу гепатита С (анти-ВГС), не содержащую HBsAg и антитела к ВИЧ-1,2, которая инактивирована прогреванием в течение 3 часов при температуре 56 °С;

отрицательный контрольный образец - K^- - сыворотку крови человека, не содержащую анти-ВГС, не содержащую HBsAg и антитела к ВИЧ-1,2, инактивированную прогреванием в течение 3 часов при температуре 56 °С;

блок-раствор для разведения исследуемых сывороток;

солевой раствор для разведения концентрата конъюгата;

25-кратный концентрат фосфатно-солевого раствора с твином;

хромоген-тетраметилбензидин;

стоп-реагент - серная или соляная кислота в концентрации 1 моль/л.

пластиковую емкость для реагентов.

Иммуноферментный анализ выполняют следующим образом:

1. Готовят фосфатно-солевой раствор с твином, предназначенный для промывания планшета. Концентрат фосфатно-солевого раствора с твином в количестве 10,0 мл разводят дистиллированной водой до конечного объема 0,25 л.

2. Готовят конъюгат к работе. Чистым наконечником отбирают из флакона 0,2 мл концентрата конъюгата и разводят добавлением 2,0 мл раствора солевого раствора. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

3. Готовят субстратную смесь. Отбирают в чистый флакон 5,0 мл субстратного буферного раствора. 0,5 мл раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина растворяют в 5,0 мл субстратного буферного раствора и тщательно перемешивают.

4. В три лунки планшета с иммуносорбентом заливают по 100 мкл K^- , в одну лунку - K^+ 100 мкл. В остальные лунки вносят по 30 мкл блок-раствора для разведения исследуемых сывороток и по 70 мкл образцов исследуемых сывороток. Содержимое лунок тщательно перемешивают осторожным постукиванием по краям планшета. Планшет закрывают

ВУ 3779 U 2007.08.30

крышкой и выдерживают 60 мин при температуре $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Неиспользованные K^+ и K^- можно хранить при температуре $(6 \pm 2) ^\circ\text{C}$ на протяжении срока годности тест-системы.

5. Содержимое лунок отсасывают в сосуд с 5-6 % раствором монохлорамина и стрипы отмывают 4 раза фосфатно-солевым раствором с твином, заполняя лунки до краев (не менее 350 мкл), при объеме ячейки 340-350 мкл, выдерживая экспозицию по 40-60 сек и отсасывая промывающий раствор в сосуд с монохлорамином. После промывки в лунках не должно оставаться жидкости. При необходимости можно осушить лунки, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

6. Во все лунки используемых стрипов планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата. Планшет закрывают крышкой и выдерживают 30 мин при температуре $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

7. Содержимое лунок удаляют и планшет промывают 4 раза как в п. 2.

8. Во все лунки стрипов вносят по 100 мкл субстратной смеси и покрытый крышкой планшет инкубируют 25-30 мин в защищенном от света месте при температуре $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

9. Реакцию останавливают добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и немедленно проводят учет результатов.

10. Учет результатов проводят спектрофотметрически на плашечном фотометре предпочтительно при двух длинах волн 450 нм и 620-680 нм. Можно учитывать результаты и при одной длине волны 450 нм. Настройку прибора проводят "по воздуху". Реакцию учитывают, если средние значения оптической плотности в лунках с K^- не более 0,2 оптической единицы, а в лунке с K^+ - не ниже 1,5 оптических единиц. Каждое отдельное значение оптической плотности K^- не должно отличаться от среднего значения более чем на 30 %. Если одно из 3-х значений оптической плотности K^- выходит за пределы этой величины, его следует исключить из расчета среднего значения. Результаты анализа сывороток на присутствие анти-ВГС считают положительными, если значение оптической плотности исследуемого образца выше критического ($\text{ОП}_{\text{крит.}}$). $\text{ОП}_{\text{крит.}}$ рассчитывают по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит.}} = \text{ср. знач. ОП } \text{K}^- + 0,18,$$

где 0,18 - коэффициент, установленный методом статистической обработки результата на предприятии-изготовителе.

Положительно реагирующие образцы исследуются повторно в ИФА. Если хотя бы один из повторных анализов дает положительный результат - образец считают положительным. При отрицательных результатах повторного исследования образец считается отрицательным.

Недостатками описанной тест-системы являются:

невозможность выявления диапазона антигенного состава вируса;

дороговизна реагентов и самой тест-системы;

тест-система не позволяет определять величины показателей оптической плотности в границах, соответствующих различным степеням концентрации антигенов в биологических средах.

Известна тест-система "РекомбиБест анти-ВГС-стрип" для выявления в сыворотке крови человека антител к вирусу гепатита С методом иммуноферментного анализа [2] - прототип.

Тест-система "РекомбиБест анти-ВГС-стрип" включает емкости, представляющие собой стеклянные флаконы, герметично упакованные резиновой пробкой с алюминиевым кольцом с положительным контрольным образцом, инактивированный - K^+ с содержанием антител к антигенам вируса гепатита С и отрицательным контрольным образцом, инактивированный - K^- , а также:

иммуносорбент - пластиковый планшет разборный с лунками с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВГС, соответствующих участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS3, NS4, NS5) областью генома вируса гепатита С;

конъюгат (антитела диагностические против иммуноглобулинов человека, меченые пероксидазой хрена);

раствор для разведения сывороток;

BY 3779 U 2007.08.30

раствор для предварительного разведения;
концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином;
цитратно-фосфатный буферный раствор с перекисью водорода;
тетраметилбензидин;
стоп-реагент - серная или соляная кислота в концентрации 1 моль/л;
пластиковую емкость для реагентов.

Растворы для тест-системы упакованы в пластиковые флаконы.

Анализ выполняют следующим образом:

1. Готовят промывочный раствор (для промывки лунок стрипов). Взбалтывают содержимое флакона с концентратом фосфатно-солевого раствора (при выпадении в концентрате осадка солей прогреть его до полного растворения осадка). Отбирают необходимое количество (в соответствии с числом используемых стрипов, так как набор рассчитан на 96 анализов, включая контроли, и возможны 12 независимых постановок иммуноферментного анализа по 8 анализов, включая контроли) концентрата фосфатно-солевого раствора и разводят его дистиллированной водой до соответствующего объема.

2. Раствор для предварительного разведения тщательно взбалтывают. Растворяют контрольные образцы K^+ и K^- добавлением в каждый флакон по 600 мкл раствора для предварительного разведения.

3. Раствор для предварительного разведения тщательно взбалтывают. Готовят предварительное разведение конъюгата путем растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1 мл раствора для предварительного разведения. В пластиковую емкость отбирают необходимое количество предварительно разведенного конъюгата, добавляют соответствующее количество раствора конъюгата (все отбирается в зависимости от количества используемых стрипов), тщательно перемешивают пипетированием. Готовят раствор непосредственно перед использованием.

4. Раствор хромогена готовят непосредственно перед применением и в пластиковой емкости, входящей в состав набора. В пластиковую емкость отбирают необходимое количество тетраметилбензидина и добавляют к нему соответствующее количество цитратно-фосфатного буферного раствора с перекисью водорода, тщательно перемешивают.

5. Промывают лунки стрипов однократно промывочным раствором. Во все лунки стрипов вносят по 80 мкл раствора для разведения сывороток. В любые 2 лунки вносят по 20 мкл раствора K^- , в 2 другие - по 20 мкл K^+ , одну лунку оставляют с раствором для разведения сывороток - контроль конъюгата.

6. Во все остальные лунки вносят по 20 мкл исследуемых сывороток, получая таким образом конечное разведение сывороток 1:5.

7. Стрипы заклеивают клейкой пленкой и инкубируют 30 минут при 37 °С.

8. По окончании инкубации содержимое лунок собирают в сосуд с дезинфицирующим раствором, промывают лунки стрипов 5 раз промывочным раствором. Промывку осуществляют при помощи автоматического промывателя или вручную. Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (вносят 300 мкл раствора). По окончании промывки тщательно удаляют влагу из лунок, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге. Не допускают высыхания лунок стрипов между отдельными операциями при постановке реакции.

9. В каждую лунку вносят по 100 мкл раствора конъюгата.

10. Стрипы заклеивают клейкой пленкой и инкубируют 30 минут при 37 °С. По окончании инкубации содержимое лунок собирают в сосуд с дезинфицирующим раствором, промывают стрипы 5 раз промывочным раствором и удаляют влагу, как описано выше.

11. Готовят раствор хромогена и вносят по 100 мкл раствора хромогена.

12. Помещают планшет со стрипами в защищенное от света место на 15 минут при температуре (18-25) °С.

13. Реакцию останавливают добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента.

ВУ 3779 U 2007.08.30

14. Учет результатов проводят спектрофотометрически на плащечном фотометре, измеряя оптическую плотность на длине волны 450 нм. Настройку прибора на нулевой уровень ("бланк") осуществляют по воздуху.

Результаты исследований учитываются, если значение оптической плотности в контроле конъюгата (ОП_{кк}) и в отрицательном контроле (ОП К⁻) не более 0,2 о.е., а значение ОП К⁺ не ниже 0,8 о.е.

По результатам ИФА рассчитывают ОП критическую (ОП_{крит}) по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}(\text{К}^-) + 0,2, \quad \text{если ОП}(\text{К}^+) \text{ больше } 2 \text{ о.е.},$$

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}(\text{К}^-) + 0,1 \times \text{ОП}(\text{К}^+). \quad \text{если ОП}(\text{К}^+) \text{ меньше } 2 \text{ о.е.}$$

Для интерпретации результатов исследования сывороток используют коэффициент позитивности (КП) в условных единицах:

$$\text{КП} = \text{ОП}_{\text{иссл.сыв.}} / \text{ОП}_{\text{крит}}$$

Если КП < 1, результат оценивают как отрицательный. Если КП ≥ 1, исследуемую сыворотку расценивают как положительно реагирующую.

Недостатками прототипа являются невозможность определения антител к антигенам и комбинациям антигенов вируса гепатита С, а также не осуществляется оценка исследуемых проб как слабоположительных и сильноположительных.

Задача, на решение которой направлена предлагаемая полезная модель, заключается в создании тест-системы с образцами сывороток крови для контроля качества исследований по выявлению антител к антигенам вируса гепатита С, соответствующих участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS3, NS4, NS5 областью генома вируса гепатита С, а также возможностью оценки исследуемых проб как слабоположительных и сильноположительных.

Задача решается за счет того, что тест-система для определения антител к вирусу гепатита С включает иммуносорбент - пластиковый планшет с лунками с иммобилизованными антигенами вируса гепатита С, соответствующих участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS3, NS4, NS5 областью генома вируса гепатита С, герметично упакованные емкости с положительными образцами антител к вирусу гепатита С, соответствующих участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS3, NS4, NS5 областью генома вируса гепатита С и контрольными отрицательными образцами, причем иммуносорбент содержит антигены и их комбинации к вирусу гепатита С, емкости имеют вместимость 1000-1500 мкл, выполнены из небьющегося, непрозрачного материала, однократного применения, в качестве образцов служат сыворотки крови с наличием разных антител к антигенам, соответствующих участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS3, NS4, NS5 областью генома вируса гепатита С и их комбинаций вируса гепатита С, в качестве контрольного отрицательного образца выбран образец нормальной сыворотки крови, а также сильноположительный и слабоположительный образцы сыворотки крови по величине показателей оптической плотности выявляемых антител.

Образцы сывороток крови с наличием разных антител к антигенам предлагаемой полезной модели представляют собой:

образец сыворотки крови сильно положительной, содержащей антитела к антигенам вируса гепатита С, оптическая плотность образца сыворотки крови составляет значение от 2,5 единиц;

образец сыворотки крови слабоположительной, содержащей антитела к антигенам вируса гепатита С, оптическая плотность образца сыворотки крови составляет значение от 0,4 единиц;

образец сыворотки крови с наличием антител к участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS3, т.е. - Core, NS3;

образец сыворотки крови с наличием антител к участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS4, т.е. - Core, NS4;

BY 3779 U 2007.08.30

образец сыворотки крови с наличием антител к участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS5, т.е. - Core, NS5;

образец сыворотки крови с наличием антител к участкам белков, кодируемых структурной Core и неструктурной NS4, NS5 - Core, NS4, NS5;

2 образца сыворотки крови отрицательной, то есть не содержащей антитела к вирусу гепатита С.

Иммуноферментный анализ выполняют следующим образом:

готовят планшет с иммуносорбентом, где сорбированы разные антигены вируса гепатита С, соответствующие участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS3, NS4, NS5) областью генома вируса гепатита С. Иммуносорбент представлен разными антигенами и комбинациями антигенов вируса гепатита С. Антигены, полипептиды кодируемые структурной (core) и неструктурной (NS3) - Core, NS3 сорбированы в лунках стрипов № 1, 5, 9. Антигены, полипептиды кодируемые структурной (core) и неструктурной (NS4) - Core, NS4 сорбированы в лунках стрипов № 2, 6, 10. Антигены, полипептиды кодируемые структурной (core) и неструктурной (NS5) - Core, NS5 сорбированы в лунках стрипов № 3, 7, 11. Антигены, полипептиды кодируемые структурной (core) и неструктурной (NS4, NS5) - Core, NS4, NS5 сорбированы в лунках стрипов № 4, 8, 12. Планшет перед выполнением анализа выдерживают 15 минут при комнатной температуре.

Готовят реагенты к выполнению иммуноферментного анализа:

1. Готовят фосфатно-солевой раствор с твином, предназначенный для промывки планшета. Взбалтывают содержимое флакона с концентратом фосфатно-солевого раствора с твином (25-кратный концентрат). Отбирают необходимое количество концентрата фосфатно-солевого раствора с твином - 20-50 мл (в соответствии с числом используемых стрипов, так как набор рассчитан на 96 анализов, включая контроли, но при необходимости возможны независимые постановки иммуноферментного анализа меньшим числом, включая контроли) и разводят его дистиллированной водой до соответствующего объема - 600 мл.

2. Раствор для разведения конъюгата взбалтывают. Готовят разведение конъюгата путем растворения содержимого флакона с конъюгатом раствором для разведения конъюгата из расчета количества используемых лунок или стрипов планшета. Готовят раствор.

промывают лунки стрипов с иммуносорбентом промывочным раствором, добавляя в лунки планшета по 250-300 мкл фосфатно-солевого раствора с твином,

во все используемые лунки планшета вносят по 50-100 мкл разбавителя исследуемых проб,

в качестве контрольных образцов в тест-системе используют образцы сывороток крови с антителами к антигенам вируса гепатита С - сильноположительной K^{++} (оптическая плотность образца сыворотки крови составляет значение от 0,4 единиц), слабоположительной K^{+} (оптическая плотность образца сыворотки крови составляет значение от 2,5 единиц) и два образца отрицательной сыворотки K^{-} (соответствующих нормальной сыворотке крови), которые вносят, добавляют каждый по 10-50 мкл в 4 лунки, сорбированные с разным антигенным составом вируса гепатита С.

в качестве образцов сывороток крови с антителами к разным антигенам вируса гепатита С используют набор образцов сывороток крови полезной модели, которые добавляют каждый по 10-50 мкл в 4 лунки, в лунки с иммуносорбентом с разным антигенным составом.

Образцы сывороток с разными комбинациями антител к антигенам вируса гепатита С представляют собой:

образец сыворотки крови с наличием антител к участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS3), т.е. - Core, NS3;

образец сыворотки крови с наличием антител к участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS4), т.е. - Core, NS4;

образец сыворотки крови с наличием антител к участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS5), т.е. - Core, NS5;

образец сыворотки крови с наличием антител к участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS4, NS5) - Core, NS4, NS5;

BY 3779 U 2007.08.30

во все остальные лунки вносят исследуемые образцы каждый по 10-50 мкл в 4 лунки, сорбированные с разным антигенным составом вируса гепатита С.

планшет закрывают крышкой или стрипы заклеивают клейкой пленкой и выдерживают во влажной камере при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

по окончании инкубации содержимое лунок удаляют автоматическим устройством отмывки или собирают в сосуд с дезинфицирующим раствором, затем промывают, добавляя в лунки 250-300 мкл фосфатно-солевого раствора с твином.

во все лунки вносят по 50-100 мкл раствора конъюгата.

планшет закрывают крышкой или стрипы заклеивают клейкой пленкой и выдерживают во влажной камере при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

по окончании инкубации содержимое лунок удаляют автоматическим устройством отмывки или собирают в сосуд с дезинфицирующим раствором, затем промывают, добавляя в лунки 250-300 мкл фосфатно-солевого раствора с твином.

во все лунки вносят по 20-100 мкл субстратного раствора и выдерживают при комнатной температуре в течение 10-15 минут.

во все лунки добавляют по 50-100 мкл стоп-реагента и немедленно учитывают результат.

учет иммуноферментного анализа проводят спектрофотометрически путем измерения оптической плотности проб при длине волны 450 нм.

результаты иммуноферментного анализа оценивают по показателям оптической плотности контрольных образцов, расчету и оценке средних показателей оптической плотности контролей, а также расчет критического значения оптической плотности образцов проводят согласно инструкции данной тест-системы.

Предлагаемая полезная модель позволяет выполнить контроль работы тест-системы прототипа.

Для определения качества работы контролей в тест-системе "РекомбиБест анти-ВГС-стрип" выполняют постановку иммуноферментного анализа:

готовят необходимое количество стрипов (с иммуносорбентом) из пластикового разборный планшета с лунками с иммобилизованными рекомбинантными антигенами вируса гепатита С, соответствующих участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS3, NS4, NS5) областью генома вируса гепатита С. Количество стрипов (по 8 лунок) используемое в работе определяют по количеству исследуемых проб. В данном случае количество стрипов составляет 3 штуки (на 24 пробы).

Готовят реагенты к выполнению иммуноферментного анализа:

1. Взбалтывают содержимое флакона с концентратом фосфатно-солевой раствор (при выпадении в концентрате осадка солей прогреть его до полного растворения осадка). Отбирают необходимое количество (в соответствии с числом используемых стрипов, так как набор рассчитан на 96 анализов, включая контроли, и возможны 12 независимых постановок иммуноферментного анализа по 8 анализов, включая контроли) концентрата фосфатно-солевого раствора и разводят его дистиллированной водой до соответствующего объема.

2. Раствор для предварительного разведения тщательно взбалтывают. Растворяют контрольные образцы K^+ и K^- добавлением в каждый флакон по 600 мкл раствора для предварительного разведения.

3. Раствор для предварительного разведения тщательно взбалтывают. Готовят предварительное разведение конъюгата путем растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1 мл раствора для предварительного разведения. В пластиковую емкость отбирают необходимое количество предварительно разведенного конъюгата, добавляют соответствующее количество раствора конъюгата (все отбирается в зависимости от количества используемых стрипов), тщательно перемешивают пипетированием. Готовят раствор непосредственно перед использованием.

4. Раствор хромогена готовят непосредственно перед применением и в пластиковой емкости, входящей в состав набора. В пластиковую емкость отбирают необходимое коли-

BY 3779 U 2007.08.30

чество раствора 3,3',5,5'-тетрометилбензидина и добавляют к нему соответствующее количество цитратно-фосфатного буферного раствора с перекисью водорода, тщательно перемешивают.

5. Промывают лунки стрипов однократно промывочным раствором.

в лунки стрипов для подвергающихся контролю проб вносят по 80 мкл раствора для разведения сывороток. В стрипы из тест-системы подвергаемой контролю вносят в любые 3 лунки по 20 мкл раствора K^- и в 4 другие - по 20 мкл K^+ , одну лунку оставляют с раствором для разведения сывороток - контроль конъюгата. Каждый образец сыворотки из набора сывороток крови, входящих в данную полезную модель, вносят в лунки планшета по 100 мкл (по 2 лунки на каждый образец).

стрипы заклеивают клейкой пленкой и инкубируют 30 минут при 37 °С.

по окончании инкубации содержимое лунок собирают в сосуд с дезинфицирующим раствором, промывают лунки стрипов 5 раз промывочным раствором. Промывку осуществляют при помощи автоматического промывателя или вручную. Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (вносят 300 мкл раствора). По окончании промывки тщательно удаляют влагу из лунок, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге. Не допускают высыхания лунок стрипов между отдельными операциями при постановке реакции.

в каждую лунку вносят по 100 мкл раствора конъюгата.

стрипы заклеивают клейкой пленкой и инкубируют 30 минут при 37 °С.

по окончании инкубации содержимое лунок собирают в сосуд с дезинфицирующим раствором, промывают стрипы 5 раз промывочным раствором и удаляют влагу, как описано выше.

готовят раствор хромогена и вносят по 100 мкл раствора хромогена.

помещают планшет со стрипами в защищенное от света место на 15 мин при температуре (18-25) °С.

реакцию останавливают добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента.

3. Учет результатов проводят в соответствии с инструкцией по применению контролируемой тест-системы. Отрицательные контрольные образцы не должны быть положительными. Исследуемая концентрация анти-НСV считается выявленной, если результат испытаний образца в обеих лунках положительный. У положительных контролей или проб в случае получения положительного результата только в одной из двух лунок, испытание повторяют в четырех лунках. Окончательно концентрация анти-НСV считается выявленной, если положительный результат получен во всех четырех лунках. Если заведомо известные положительные пробы образцов не выявлены, то чувствительность данной тест-системы недостаточна для проведения исследований.

При определении чувствительности тест-систем и наборов иммуноферментных рекомендуется использовать все образцы сывороток, входящих в состав набора.

Предлагаемая тест-система для определения антител к вирусу гепатита С, состоящая из набора образцов нативных сывороток крови, содержащих комбинации антител к антигенам гепатита С, позволяет диагностировать вирусный гепатит и служит для внешнего контроля качества работы лабораторий, скрининга сывороток и для научно-исследовательских целей. Полезная модель может использоваться для стандартизации исследований по выявлению разных комбинаций антител к вирусу гепатита С методом иммуноферментного анализа и оценки специфичности и чувствительности отечественных и зарубежных иммуноферментных тест-систем, а также для использования в качестве позитивных и негативных контролей сравнения в тест-системах. Техническим результатом разработки данной полезной модели является более высокая чувствительность и специфичность определения антител к вирусу гепатита С.