



REF	C-153		96
REF	C-150		192
REF	C-155		480

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ИФА-АНТИ-НСV»
Тест-система иммуноферментная для выявления антител
к вирусу гепатита С

Содержание

I. Назначение.....	2
II. Принцип теста.....	2
III. Состав набора «ИФА-АНТИ-НСV»	2
IV. Аналитические и диагностические характеристики.....	3
V. Меры предосторожности.....	3
VI. Инструкции по безопасности.....	4
VII. Утилизация и уничтожение	4
VIII. Необходимые материалы и оборудование, не предоставляемые с набором реагентов	4
IX. Отбор и подготовка образцов.....	4
X. Подготовка реагентов.....	5
XI. Проведение анализа.....	5
XII. Учет результатов.....	7
XIII. Ограничения теста.....	8
XIV. Срок годности. Условия хранения и транспортирования.....	8
XV. Объяснение символов.....	8
XVI. Список литературы.....	8
Приложение 1.....	9
Приложение 2.....	10
Приложение 3.....	12

Набор реагентов выпускается в 3 комплектах.

Комплект № 1 рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные; предназначен как для ручной постановки, так и для постановки на ИФА-анализаторах открытого типа с возможностью дробного использования.

Комплект № 2 рассчитан на проведение 192 (два разборных планшета) определений, включая контрольные; предназначен как для ручной постановки, так и для постановки на ИФА-анализаторах открытого типа с возможностью дробного использования.

Комплект № 3 рассчитан на проведение 480 (пять разборных планшетов) определений, включая контрольные; предназначен как для ручной постановки, так и для постановки на ИФА-анализаторах открытого типа с возможностью дробного использования.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ИФА-АНТИ-НСV» предназначен для выявления антител класса IgG и IgM к вирусу гепатита С в сыворотке (плазме) крови, иммуноглобулинах и других препаратах, приготовленных из сыворотки (плазмы) крови человека.

II. ПРИНЦИП ТЕСТА

В основе теста лежит неконкурентный метод иммуноферментного анализа (ИФА), двухстадийный вариант.

На первой стадии анализа антитела к НСV антигену, содержащиеся в исследуемых пробах, связываются с рекомбинантными антигенами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок полистиролового планшета.

На второй стадии анализа связавшиеся антитела взаимодействуют с конъюгатом антител к IgG и IgM человека, меченных пероксидазой. Количество связавшихся молекул конъюгата прямо пропорционально количеству антител в исследуемом образце.

Во время инкубации с субстратной смесью происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации антител в анализируемых пробах.

III. СОСТАВ НАБОРА «ИФА-АНТИ-НСV»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска		
	Комплект № 1	Комплект № 2	Комплект № 3
Иммуносорбент - планшет полистироловый 96-луночный разборный, в лунках которого сорбированы: смесь рекомбинантных антигенов вируса гепатита С – core, NS3, NS4, NS5.	1 планшет	2 планшета	5 планшетов
Конъюгат (концентрат), жидкий - смесь конъюгатов антител к иммуноглобулинам G и M человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	2 флакона по 3,5 мл или 3 флакона по 2,5 мл
БР – непрозрачная красного цвета жидкость, допустимо образование аморфного осадка, распадающегося при встряхивании. или БР – зелёного цвета жидкость, допустимо образование аморфного осадка, распадающегося при встряхивании.	1 флакон 11,0 мл	1 флакон 11,0 мл	2 флакона по 11,0 мл
РРК – прозрачная или слегка опалесцирующая жёлтого или светло-желтого цвета жидкость, допустимо образование аморфного осадка, при встряхивании распадающегося и приводящего к помутнению раствора.	1 флакон 25,0 мл	1 флакон 25,0 мл	3 флакона по 25,0 мл
К+ (контрольный положительный образец), сыворотка крови человека, содержащая антитела к структурным и неструктурным белкам вируса гепатита С (анти-НСV), и не содержащая HBsAg и антитела к ВИЧ-1,2, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	2 флакона по 2,5 мл или 1 флакон 5,0 мл
К- (контрольный отрицательный образец), сыворотка крови человека, не содержащая HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	3 флакона по 2,5 мл или 2 флакона по 4,0 мл
ПР (промывочный раствор) – концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т). Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании.	1 флакон 50,0 мл	1 флакон 120,0 мл	2 флакона по 120,0 мл
СБ - субстратный буферный раствор, цитратный буфер, содержащий раствор перекиси водорода. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	2 флакона по 50,0 мл или 3 флакона по 25,0 мл

Хромоген ТМБ - раствор, содержащий 3,3',5,5'- тетраметилбензидин. Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	2 флакона по 3,5 мл или 3 флакона по 2,5 мл
Стоп-реагент - раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	1 флакон 50,0 мл или 2 флакона по 25,0 мл	2 флакона по 50,0 мл или 4 флакона по 25,0 мл

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами. Имеется цветовая кодировка реагентов, а также маркировка посредством штрих-кодов. Возможна комплектация увеличенными объемами реагентов или увеличенным количеством реагентов в стандартных дозировках.

Реагенты помещают в коробку картонную, куда вкладывают инструкцию по применению.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены принадлежности	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или	1 шт.	2 шт.	5 шт.
	защитная пленка для ИФА планшетов	2 шт.	4 шт.	10 шт.
	Пластиковая скрепка или полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock	1 шт.	2 шт.	3 шт.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.	4 шт.	10 шт.
	Одноразовые наконечники	16 шт.	32 шт.	80 шт.

IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

(см. Приложение 2 к данной инструкции).

V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ Министерства здравоохранения РФ № 4Н от 06 июня 2012 г.).

5.2. Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой.
- Нельзя использовать реагенты с истекшим сроком годности.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:
 - неспецифических компонентов (ПР, СБ), которые взаимозаменяемы во всех тест-системах производства ООО «НПО «Диагностические системы»;
 - стоп-реагента, который может быть взаимозаменяемым в зависимости от молярности раствора;
 - за более детальной информацией относительно других реагентов обратитесь в нашу службу поддержки пользователей по телефону бесплатной линии 8-800-555-0300 (доб. 7655, 7647) или по E-mail: info@npods.nnov.ru.
- Перед использованием все реагенты выдержать при комнатной температуре в течение 30 мин.
- Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить тест в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на ферментативную активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.
- Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной. Многократные ванночки для автоматических анализаторов необходимо сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной. Затем промыть 70% раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной.
- Нельзя допускать высыхания лунок иммуносорбента (планшета) между отдельными операциями.
- Возможна дополнительная (предварительная) промывка лунок иммуносорбента (планшета) между отдельными операциями.
- Ферментативная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстратов.
- Необходимо использовать новый наконечник для каждого образца или реагента.
- Промывка лунок - важный этап в данной процедуре: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполнены, не допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.
- Нельзя использовать одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и растворов.

- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование.
- Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- Необходимо использовать воду высокого качества.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию тепла или света во время инкубации и хранения.

VI. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении отрицательного контрольного образца были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к гепатиту С и ВИЧ-1,2.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении положительного контрольного образца были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к ВИЧ-1,2.
- *При работе с реагентами набора (К-, К+) и исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.*
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с набором реагентов с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами, реагентами, промывочными растворами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спецодежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезинфицировать поверхность 3% раствором хлорамина Б.
- Необходимо избегать контакта субстратного буфера, хромогена, стоп-реагента с кожей и слизистыми.
- После проведения ферментативной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или пробы и реагенты, любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кг/см² (0,15 МПа). Допустимо обеззараживание твердых отходов способом погружения в 3% раствор хлорамина Б (длительность дезинфекции не менее 1 часа) или другого разрешенного к промышленному выпуску и применению в РФ дезинфицирующего средства. Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или другого хлорсодержащего средства. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.

VII. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

При утилизации и уничтожении все реагенты и материалы, являющиеся отходами, должны быть обработаны в соответствии с действующими нормативами (СанПиН 2.1.7.2790-10, СП 1.3.2322-08, МУ-287-113).

VIII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или предварительно устанавливаемые одноканальные или многоканальные пипетки с изменяемым объемом для отбора жидкостей.
- Одноразовые наконечники к пипеткам.
- Инкубатор микропланшетный или термостатируемый шейкер.
- Автоматический микропланшетный вошер.
- Градуированные цилиндры: 25 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Микропланшетный ридер с возможностью измерения оптической плотности (ОП) при фильтрах 450 нм и 620-680 нм.
- Для постановки ИФА в автоматическом режиме - любая модель ИФА-анализаторов открытого типа (например, автоматический анализатор типа «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN», Швейцария).
- За более детальной информацией обратитесь в нашу службу поддержки пользователей по телефону бесплатной линии 8-800-555-0300 (доб. 7647, 7655) или по E-mail: info@npods.nnov.ru.

IX. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови должен проводиться в соответствии с надлежащей практикой методом венопункции. В качестве исследуемых образцов могут быть использованы сыворотка (плазма) крови человека, иммуноглобулины и другие препараты, приготовленные из сыворотки (плазмы) крови человека. Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец сыворотки следует отбирать новым наконечником! Образцы можно хранить в соответствии требованиями существующих нормативных документов. Допускается длительное

хранение образцов (несколько месяцев) при условии глубокой заморозки (ниже -20°C). Нельзя использовать сыворотку (плазму), замороженную и размороженную более 3-х раз. Сыворотку от эритроцитов или плазму от сгустка следует отделить как можно быстрее, чтобы избежать гемолиза. Гемолиз может повлиять на рабочие характеристики теста. Исследование образцов с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией не допускается, т. к. может дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием.

Лиофильно высушенные препараты крови перед исследованием в тест-системе разводить в соответствии с инструкцией по применению данного препарата. Жидкие препараты крови использовать неразведенными, за исключением препаратов крови, содержащих иммуноглобулины. Препараты крови, содержащие иммуноглобулины, необходимо предварительно разводить в 50 раз рабочим ПР.

Образцы, консервированные азидом натрия, анализу не подлежат!

X. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты готовые к применению:

- **Иммуносорбент.** Каждый планшет, содержащий 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть пакет и вынуть планшет. Взять нужное количество стрипов. Неиспользованные стрипы без рамки поместить обратно в пакет. После вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8°C , при условии, что пакет герметично закрыт с помощью полиэтиленового пакета с замком Zip-Lock или с помощью скрепки. Не допускается удалять силикагель из пакета.
- К- - контрольный отрицательный образец
- К+ - контрольный положительный образец
- РРК - раствор для разведения конъюгата
- БР - блок-раствор для рабочего разведения сывороток
- Стоп-реагент 0,2 моль/л.

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

Рабочий промывочный раствор (ПР). Содержимое флакона с концентратом (x 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимый объем концентрата (x 25) промывочного раствора развести соответствующим объемом воды дистиллированной (см. табл. 2 и 3). Полученный раствор тщательно перемешать. Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут. при комнатной температуре или 28 сут. при температуре от 2 до 8°C .

Рабочий раствор конъюгата. Готовить перед использованием. Для приготовления рабочего раствора конъюгата необходимый объем концентрата (x 11) конъюгата развести соответствующим объемом РРК (см. табл. 2 и 3). Полученный раствор осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Допускается приготовление рабочего раствора конъюгата в первичных флаконах с РРК. Рабочий раствор конъюгата стабилен не более 12 ч в защищенном от света месте при комнатной температуре.

Субстратная смесь (СС). Готовить перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (см. табл. 2 и 3), тщательно перемешать до полного растворения. Допускается приготовление субстратной смеси в первичных флаконах с СБ. Допустимо хранение СС не более 10 ч в защищенном от света месте при комнатной температуре в чистых флаконах или специальной емкости, предназначенной для постановки ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

После вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными реагенты хранить в течение срока годности тест-системы.

XI. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при комнатной температуре.

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблице 2:

Таблица 2

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов при ручной постановке ИФА

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор (ПР)		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц. x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. x 11) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
1	3,0	72,0	0,10	1,0	0,10	1,0
2	6,0	144,0	0,20	2,0	0,20	2,0
3	9,0	216,0	0,30	3,0	0,30	3,0
4	12,0	288,0	0,40	4,0	0,40	4,0
5	15,0	360,0	0,50	5,0	0,50	5,0
6	18,0	432,0	0,60	6,0	0,60	6,0
7	21,0	504,0	0,70	7,0	0,70	7,0

8	24,0	576,0	0,80	8,0	0,80	8,0
9	27,0	648,0	0,90	9,0	0,90	9,0
10	30,0	720,0	1,00	10,0	1,00	10,0
11	33,0	792,0	1,10	11,0	1,10	11,0
12	40,0	960,0	1,20	12,0	1,20	12,0

Внимание! Возможны две альтернативные процедуры инкубации планшета. Очень важно, чтобы каждый этап постановки реакции осуществлялся по одной и той же процедуре. Сочетание процедур инкубации не допускается.

Проведение ИФА

Процедура 1 – инкубатор микропланшетный:

1. При внесении контрольных образцов в зависимости от количества используемых стрипов рекомендуется следующая схема:

- 1 стрип - 1 лунка К+ и 2 лунки К-
- 2 стрипа - 1 лунка К+ и 2 лунки К-
- 3 стрипа и более - 2 лунки К+ и 3 лунки К-

В лунки стрипа, например, А-1 и В-1 пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К+, в 3 лунки С-1, D-1, Е-1 - по 100 мкл К-. В остальные лунки внести по 30 мкл блок-раствора и по 70 мкл исследуемых образцов. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краю планшета. Если образцы внесены, то цвет содержимого лунок должен измениться с красного на розово-оранжевый (*при комплектации набора БР красного цвета*) или с зеленого на пурпурный (*при комплектации набора БР зеленого цвета*).

2. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в течение 1 ч в инкубаторе микропланшетном при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

3. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала (аккуратно, с помощью вошера или многоканальной пипетки) и планшет промыть 4 раза рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 500 мкл в лунку), выдерживая 40 с и удаляя промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала. Рекомендуется использовать автоматический микропланшетный вошер. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа. Удалить остатки влаги путем отстукивания по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата и покрытый крышкой или защитной пленкой планшет выдержать в течение 30 мин в инкубаторе микропланшетном при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, после чего планшет промыть 4 раза рабочим ПР, как указано в п. 3.

5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл СС и выдержать планшет 20 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.

6. Реакцию остановить добавлением в лунки по 150 мкл стоп-реагента и провести учет результатов.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении 2.

Процедура 2 – термостатируемый шейкер:

1. При внесении контрольных образцов в зависимости от количества используемых стрипов рекомендуется следующая схема:

- 1 стрип - 1 лунка К+ и 2 лунки К-
- 2 стрипа - 2 лунки К+ и 2 лунки К-
- 3 стрипа и более - 2 лунки К+ и 3 лунки К-

В лунки стрипа, например, А-1 и В-1 пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К+, в 3 лунки С-1, D-1, Е-1 - по 100 мкл К-. В остальные лунки внести по 30 мкл блок-раствора и по 70 мкл исследуемых образцов. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краю планшета. Если образцы внесены, то цвет содержимого лунок должен измениться с красного на розово-оранжевый (*при комплектации набора БР красного цвета*) или с зеленого на пурпурный (*при комплектации набора БР зеленого цвета*).

2. Планшет инкубировать в течение 1 ч в термошейкере при 500 об/мин и температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

3. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала (аккуратно, с помощью вошера или многоканальной пипетки) и планшет промыть 4 раза рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 500 мкл в лунку), выдерживая 40 с и удаляя промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала. Рекомендуется использовать автоматический микропланшетный вошер. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа. Удалить остатки влаги путем отстукивания по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата и инкубировать планшет в течение 20 мин в термошейкере при 500 об/мин и температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, после чего планшет промыть 4 раза рабочим ПР, как указано в п. 3.

5. Далее постановку проводить аналогично п. 5 и 6 Процедуры 1.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении 2.

7. Проведение анализа в автоматическом режиме на автоматическом анализаторе открытого типа*.

Таблица 3

Рекомендуемый расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов или на целый планшет при постановке ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа

Количество используемых стрипов	Комплект	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Субстратная смесь	
		ПР (конц. x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. x 11) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
3	1	10,0	240,0	0,5	5,0	0,5	5,0
4	1	15,0	360,0	0,6	6,0	0,6	6,0
6	1, 3	20,0	480,0	0,7	7,0	0,7	7,0
8	1, 2	30,0	720,0	0,82	8,2	0,8	8,0
12	1, 2, 3	40,0	960,0	1,2	12	1,2	12

7.1. Задать программу проведения ИФА и включить анализатор.

7.2. Приготовленный рабочий промывочный раствор залить в предназначенную для него емкость, остальные рабочие растворы и реагенты поместить в специальные контейнеры или емкости, контрольные образцы К⁺ и К⁻ - во флаконах, образцы исследуемых сывороток - во флаконах или пробирках в объеме не менее 300 мкл установить в соответствующие штативы анализатора; поместить в анализатор необходимое количество иммуносорбентов. Далее постановку проводить в соответствии с инструкцией по применению ИФА-анализатора и программой проведения ИФА.

7.3. По окончании анализа прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов К⁺ и К⁻.

7.4. Реакцию следует учитывать, если значения оптической плотности (ОП) в лунках с К⁺ не менее 1,5, а среднее значение ОП в лунках с К⁻ не более 0,2. Далее учет результатов проводить аналогично п IX.

*при отсутствии в программе промывающего устройства стандартных опций, таких как придонная и перекрестная аспирация, регулировка позиций донной аспирации, скорости промывки и силы потока наливаемой жидкости, времени замачивания и времени аспирации, а также скорости встряхивания, во избежание получения не корректных результатов, допускается введение в процедуру дополнительной отмывки планшета.

8. Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест-системы «ИФА-АНТИ-НСV» на автоматических ИФА-анализаторах:

8.1. Контроль внесения образцов сыворотки рекомендуется проводить при длине волны **450 (492) нм**, критерий: ОП > 1,000 (при комплектации набора БР красного цвета) или при длине волны **540(550) нм**, критерий: ОП > 1,400 (при комплектации набора БР зелёного цвета).

8.2. Контроль внесения конъюгата рекомендуется проводить при длине волны 405 нм, критерий: ОП > 0,390.

ХII. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов провести спектрофотометрически при двух длинах волн – 450 нм и при референс-длине волны в диапазоне от 620 до 680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учёт результатов при одной длине волны - 450 нм.

Реакцию учитывать, если среднее значение ОП в лунках с К⁺ не менее 1,5, а среднее значение ОП в лунках с К⁻ не более 0,2**. Положительными считать образцы со значениями ОП превышающими или равными критическому значению ОП (ОП крит.).

ОП крит. рассчитывать по формуле:

$$\text{ОП крит.} = \text{ср. знач. ОП К-} + \text{А,}$$

**Значения ОП К⁻ и исследуемых образцов сывороток ниже 0,00 (со знаком «-») при расчетах ОПкрит. и анализе результатов считать равными нулю.

где А - коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов ИФА на предприятии-изготовителе, величину которого указывают для каждой серии в инструкции по применению, вкладываемой в коробку с набором и в паспорте на серию данного препарата***.

Допустимо проводить учет результата реакции с помощью расчета коэффициента позитивности (КП). Коэффициент позитивности рассчитывается по формуле:

$$\text{КП} = \text{ОПобразца} / \text{ОПкрит.}$$

Положительно реагирующие образцы исследовать повторно в данном тесте не менее, чем в двух лунках. Если хотя бы один из повторных анализов даёт положительный результат - образец считать положительным. При отрицательных результатах повторного исследования образец считать отрицательным. Все положительные образцы должны быть исследованы в подтверждающих ИФА-тестах (предпочтительно “ДС-ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР-GM”) или в иммуноблоттинге, или в ПЦР.

*** «Для серии № 011XXX величина коэффициента А=0,300»

ХШ. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

- Необходимо внимательно прочитать инструкцию по применению до проведения теста и чётко ее соблюдать, обратив особое внимание на этапы при внесении образцов и реагентов, при отмывке планшета и на время стадий инкубации.
- Заключение о положительной реактивности образцов к вирусу гепатита С не должно быть основано на единственном реактивном результате тестирования. Все положительные образцы должны быть проверены в подтверждающих ИФА-тестах, в иммуноблоттинге или ПЦР.
- Отрицательные результаты могут быть получены, если количество антител к вирусу гепатита С в образце ниже уровня чувствительности теста или если они отсутствуют на той стадии болезни, в которой образец был отобран. Отрицательный результат при скрининге не исключает возможность процесса и инфицирования вирусом гепатита С.
- Различия в результатах тестирования образцов от пациентов, зараженных вирусом гепатита С, различными тестами (особенно во время сероконверсии) могут быть вызваны отличиями в иммунологических реакциях в зависимости от вида используемых антигенов.
- Изменчивость вируса гепатита С не позволяет исключить возможность ложноотрицательных результатов. Ни один из известных методов тестирования не может дать полную гарантию, что вирус гепатита С отсутствует.

ХIV. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности указан на упаковке набора. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Хранение - в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование - при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование и хранение при температуре до 27 °С 10 суток и до 30 °С 5 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя – ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 603093, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

Для проведения расследования и получения объективных выводов по заявленной рекламации необходимо предоставление:

1. рекламационного набора,
2. всех образцов кроводач пациента,
3. протоколов исследований с использованием других методов с указанием серии, сроков годности и фамилии оператора,
4. протоколов исследований с использованием референтных тестов с указанием серии, сроков годности и фамилии оператора.

ХV. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Производитель
	Каталожный номер
	Количество определений
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности число/месяц/год
	Использовать инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество
Code: X.X.XX	Идентификационный код

ХVI. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

См. Приложение 1 к данной инструкции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lok A. S., Gunaratnam N.T. Diagnosis of Hepatitis C //Hepatology. – 1997. – V.26. – N.3. – P.485-512.
2. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. Санкт-Петербург, 1998. – С.201-245.
3. «Гепатит С (Российский консенсус). 26-27 сентября 2000, Москва. На сайте www.hepatitis.ru.
4. Colin C., Lanoir D., Tauzet S. et.al. Sensibility and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of literature// J. Viral Hepatitis. – 2001. – V.8. – P.87–95.
5. Михайлов М.И. Лабораторная диагностика гепатита С. //Вирусные гепатиты. – 2001. – №2.– С.8-16.
6. Pawlovsky J.M., et al. Molecular diagnosis of viral hepatitis// Gastroenterology. – 2002. – V.122. – P.1554-1568.
7. Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Service. Atlanta. GA 30333. Recommendation for Prevention and Control of Hepatitis C virus (HCV) Infection and HCV-related Chronic Disease. Morbidity and Mortality Weekly Report. – February 7, 2003. – V. 52. – No. RR-3.
8. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). 2003. – 384 с.
9. Кузина Л.У., Ястребова О.Н. и др. Сравнительная оценка результатов определения антител к вирусу гепатита С при использовании различных иммуноферментных тест-систем и подтверждающих тестов// Вопросы вирусологии. – 2004. – №6. – С.41-44.
10. Иванов А.В., Кузякин А.О., Кочетков С.Н. Молекулярная биология вируса гепатита С// Успехи биологической химии. – 2005. – Т.45. – С.37-86.
11. Ulanova T.I., Puzyrev V.F., Kulikova L.V., Bochkova G.B., Golubeva I. F., Obriadina A.P., Burkov A.N. A new anti-HCV EIA based on recombinant antigens derived from different sequences variants of hepatitis C virus//15- th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – Copenhagen, Denmark, 2005. – P.203.
12. Пат.№2262704. Российская Федерация. Набор антигенов для определения антител к вирусу гепатита С «ДС- HCV-антигены»/ Бурков А.Н. и др. – Заявлено 06.10.2004. – № 2004129264. – Зарегист. 20.10.2005.
13. Bochkova G.B., Polushina D.A., Kulikova L.V., Fomina C.N., Burkov A.N., Obriadina A.P., Ulanova T.I. Anti-HCV profile in serum specimens from HCV infected patients coinfecting with opportunistic diseases//12-th International symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. – July 1-5, 2006, Paris. – S.107.
14. Сенягина Н.Е., Фомина С.Н., Никишина М.Г., Бочкова Г.Б., Зорин В.В., Обрядина А.П., Бурков А.Н., Уланова Т.И. Особенности выявления анти-HCV у детей с перинатальной передачей вируса гепатита С//Вирусные гепатиты – эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика. – VII Российская научно-практическая конференция с международным участием. – 29-31 мая, 2007, Москва.
15. Fomina S., Senyagina N., Nikishina M., Polushina D., Bochkova G., Puzyrev V., Obriadina A., Ulanova T. The diagnostics of the perinatally transmitted HCV infection in babies.– 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. – Sept. 9-13, 2007, Glasgow. – P.120.
16. Сенягина Н.Е., Фомина С.Н., Бочкова Г.Б., Зорин В.В., Бурков А.Н., Обрядина А.П., Уланова Т.И. Особенности серологической диагностики вирусного гепатита С при перинатальной передаче инфекции //Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний. – 2007. – №2-3. – С.7-8.
17. Bochkova G., Polushina D., Fomina C., Senyagina N., Puzyrev V., Burkov A., Ulanova T. The diagnostic value of the detection anti-HCV IgM to different Hepatitis C antigens. –15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. – Oct. 5-10, 2008, Texas.
18. Bochkova G., Fomina S., Senyagina N., Puzyrev V., Obriadina A., Burkov A., Ulanova T. The correlation of HCV RNA and anti-HCV IgM to different HCV antigens//13-th International symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. – March 20-24, 2009, Washington.
19. Bochkova G.B., Puzyrev V.F., Obriadina A.P., Burkov A.N., Ulanova T.I. The evaluation of the ELISA kit “EIA-anti-HCV” with new recombinant antigens //20-th European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases. – April 10-13, 2010, Vienna. – P.118.
20. Bochkova G.B., Fomina S., Puzyrev V.F., Obriadina A.P., Burkov A.N., Ulanova T.I. The evaluation of the ELISA kit “DS-EIA-anti-HCV- SPECTR-GM” as supplemental assay for confirmation of anti-HCV screening positive results //21-th European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases. – May 7-10, 2011, Milan. – P.2235.
21. Bochkova G., Fomina S., Puzyrev V., Obriadina A., Burkov A., Ulanova T. The evaluation of the new ELISA kit “EIA- ANTI -HCV-SPECTRUM-M” intended for separate detection of anti-IgM to different HCV antigens// The Viral Hepatitis Congress. – Frankfurt, Sept. 7-9, 2012. – P2. / Journal of Viral Hepatitis. – 2012. – V.19 (Suppl. 3). – P. 5-6.
22. Bochkova G., Fomina S., Shabalina T., Puzyrev V., Obriadina A. Burkov A. Ulanova T. The value of Anti-HCV IgG avidity index and anti-HCV IgG profile for distinguishing of acute and chronic hepatitis C virus infection //19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. – Venice, Oct. 5-9, 2012. – P 264.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность

Диагностическую чувствительность набора реагентов «ИФА-АНТИ-НСV» определяли при исследовании:

1. 469 образцов сывороток от больных с острым и хроническим гепатитом С. Чувствительность составила 100%.
2. 200 образцов сывороток крови пациентов, содержащие антитела к гепатиту С. Чувствительность составила 100%.
3. 39 свежееотобранных образцов сыворотки крови. Чувствительность составила 100%.
4. 82 образца сывороток крови, взятой у пациентов с высоким риском выявления гепатита С. Чувствительность составила 100%.
5. 203 образца сывороток, содержащих анти-НСV генотипа 1-6. Чувствительность составила 100%.
6. 44 коммерческих сероконверсионных панелей (BBI Inc., ZeptoMetrix, США) – были получены результаты, представленные в таблице.
7. Anti-HCV Mixed Titer Performance Panel BBI PHV 206. Чувствительность составила 100%.
8. Anti-HCV Mixed Titer Performance Panel BBI PHV 207. Чувствительность составила 100%.
9. Стандартной панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела к вирусу гепатита С, «ДС-Стандартной панели-анти-НСV» (Россия). Чувствительность составила 100%.

Все положительные образцы были подтверждены с помощью реакции в тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР-GM».

Таблица

Панель	«Abbott AxSYM HCV v.3.0»	«Monolisa Anti-HCV Plus v.2»	«ИФА-АНТИ-НСV»
	Количество положительных результатов по сравнению с количеством протестированных образцов		
ZMC HCV 6212	8/9 ³	5/9 ²	5/9 ²
ZMC HCV 6213	3/12 ¹	2/13 ³	3/12 ¹
ZMC HCV 6214	6/13 ¹	3/13 ³	5/13 ¹
ZMC HCV 6215	0/4 ³	1/4 ²	2/4 ²
ZMC HCV 6216	1/7 ¹	0/7 ³	1/7 ¹
ZMC HCV 6222	1/8 ¹	No tested	1/8 ¹
ZMC HCV 6224	2/6 ¹	No tested	0/6 ¹
ZMC HCV 6225	2/19 ¹	No tested	2/19 ¹
ZMC HCV 6226	4/12 ¹	No tested	4/12 ¹
ZMC HCV 6227	2/7 ¹	No tested	2/7 ¹
ZMC HCV 6229	3/8 ¹	2/8 ²	2/8 ¹
ZMC HCV 9041	4/8 ¹	4/8 ³	4/8 ¹
ZMC HCV 9044	2/6 ¹	2/6 ³	3/6 ¹
ZMC HCV 9046	4/5 ³	4/5 ²	4/5 ²
ZMC HCV 9047	4/10 ³	3/10 ²	6/10 ²
ZMC HCV 9054	1/10 ¹	1/10 ³	3/10 ¹
ZMC HCV 9055	0/11 ¹	0/11 ³	3/11 ¹
ZMC HCV 9058	1/5 ¹	No tested	5/5 ¹
ZMC HCV 10057	2/7 ³	2/7 ²	2/7 ²
ZMC HCV 10058	2/7 ³	7/7 ²	7/7 ²
ZMC HCV 10062	No tested	2/8 ²	2/8 ²
ZMC HCV 10071	4/7 ³	4/7 ²	6/7 ²
ZMC HCV 10165	4/9 ³	4/9 ²	5/9 ²
ZMC HCV 10185	4/5 ³	4/5 ²	4/5 ²
ZMC HCV 77890	No tested	7/16 ⁴	7/16 ⁴
BBI PHV 904	3/7 ³	3/7 ³	3/7 ⁴
BBI PHV 905	2/9 ³	3/9 ²	3/9 ²
BBI PHV 906	5/7 ³	5/7 ²	5/7 ²
BBI PHV 907	2/7 ³	4/7 ³	4/7 ⁴
BBI PHV 908	5/13 ³	7/13 ²	10/13 ²
BBI PHV 910 (M)	3/5 ³	2/4 ^{*2}	4/4 ^{*2}
BBI PHV 911(M)	3/5 ³	2/4 ^{**2}	3/4 ^{**2}
BBI PHV 912	1/3 ²	1/3 ²	3/3 ²
BBI PHV 913	0/4 ³	2/4 ²	4/4 ²
BBI PHV 914	4/9 ³	4/9 ²	6/9 ²
BBI PHV 915	2/4 ³	2/4 ³	4/4 ²
BBI PHV 916(M)	3/8 ³	1/7 ^{***2}	1/7 ^{***2}
PHV 917	6/10 ³	6/10 ³	6/9 ^{*2}
PHV 918	2/8 ³	2/8 ³	2/7 ^{*2}
PHV 919	3/7 ³	2/7 ³	4/7 ²

RNV 920	7/10 ³	6/10 ³	8/9* ²
RNV 921	10/11 ³	No tested	11/11 ²
RNV 922	5/6 ³	No tested	6/6 ²
RNV 923	2/6 ³	No tested	2/6 ²
Всего 44	128/334 38,3%	109/275 39,6%	177/352 50,3%

* - образец 2 отсутствует,

** - образец 1 отсутствует,

*** - образец 6 отсутствует.

¹ Результаты LS Medizin Service, Апрель 2007,

² Результаты НПО «Диагностические системы»,

³ Паспортные данные панелей,

⁴ Результаты PEI, ноябрь 2010

Специфичность

Специфичность по результатам исследования, проведенного ОБТК ООО «НПО «Диагностические системы» на случайной выборке в количестве 8107 доноров составила 99,8%. По результатам внешних исследований на случайной выборке в количестве 5000 (Филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Томск «НПО «Вирион») составила 99,9%.

Дополнительно были протестированы 2560 образцов сывороток крови:

- 600 образцов сывороток крови, взятых от больных с вирусным гепатитом В;
- 1225 образцов сывороток крови, взятых от больных с различными неинфекционными заболеваниями;
- 735 образцов сывороток крови, взятых от беременных женщин.

Специфичность составила – 99,6%.

Специфичность набора реагентов, определённая по Стандартной панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела к вирусу гепатита С, «ДС-Стандартная панель-анти-НСV» (Россия), составила 100%.

Воспроизводимость

Воспроизводимость результатов внутри планшета была оценена при тестировании 3 положительных образцов для каждой из трех серий. Коэффициент вариации не превышал 9 %.

Воспроизводимость результатов между планшетами была оценена при тестировании 3 положительных образцов в 384 повторах на наборах одной и той же серии для трех серий. Коэффициент вариации не превышал 9%.

Воспроизводимость результатов между сериями была оценена при тестировании 3 положительных образцов в 1152 повторах на трех сериях. Дополнительно воспроизводимость результатов между сериями была оценена при тестировании 3 положительных образцов в течение 10 дней 2 независимыми операторами. Каждый образец тестировался в 16-ти повторах каждый день на каждой из трех серий. Коэффициент вариации не превышал 13%.

СХЕМА АНАЛИЗА

1	Внести	По 100 мкл К+, К-
2	Внести	По 30 мкл БР
3	Внести	По 70 мкл исследуемых образцов сывороток
4	Инкубировать	Процедура 1: 1 ч, $(37,0 \pm 0,5)$ °С, инкубатор микропланшетный Процедура 2: 1 ч, $(37,0 \pm 0,5)$ °С, 500 об/мин, термостатируемый шейкер
5	Промыть планшет	Рабочий ПР, не менее 500 мкл, 4 раза
6	Внести	По 100 мкл рабочего раствора конъюгата
7	Инкубировать	Процедура 1: 30 мин, $(37,0 \pm 0,5)$ °С, инкубатор микропланшетный Процедура 2: 20 мин, $(37,0 \pm 0,5)$ °С, 500 об/мин, термостатируемый шейкер
8	Промыть планшет	Рабочий ПР, не менее 500 мкл, 4 раза
9	Внести	По 100 мкл СС
10	Инкубировать	20 мин, в защищенном от света месте при комнатной температуре
11	Внести	По 150 мкл стоп-реагента
12	Учет результатов	450 нм/620-680 нм или 450 нм