

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации


Г. Онищенко
«21» _____ 2009 г.

№ 01-11/140-09

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
«ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР»

Тест-система иммуноферментная для выявления спектра антител к вирусу
гепатита С

Набор 2

«ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР-М»

Содержание

I. Назначение	3
II. Состав набора	3
III. Меры предосторожности	4
IV. Инструкции по безопасности	4
V. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемое с набором реагентов	5
VI. Отбор и подготовка образцов	6
VII. Подготовка реагентов	6
VIII. Проведение анализа	7
IX. Результаты	8
X. Срок годности. Условия хранения и транспортирования	9
XI. Объяснение символов на внутренней упаковке	9

Набор реагентов выпускается в одном комплекте.

Набор реагентов рассчитан на проведение 24 (один разборный планшет или 3 отдельных блока по 4 стрипа) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по 4 стрипа) использования набора реагентов или для одновременной постановки 24 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР-М» предназначен для идентификации спектра антител класса IgM к структурным (НСV-core-Ag) и неструктурным (НСV-NS3-Ag, НCV-NS4-Ag, и НCV-NS5-Ag) белкам вируса гепатита С в сыворотке (плазме) крови человека с целью дифференциальной диагностики и прогноза заболевания вирусным гепатитом С.

II. СОСТАВ НАБОРА «ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР-М»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммунсорбент – рекомбинантные антигены, аналогичные структурным (НСV-core-Ag) и неструктурным (НСV-NS3-Ag, НCV-NS4-Ag и НCV-NS5-Ag) белкам вируса гепатита С, сорбированные отдельно на стрипах планшета полистиролового 96-луночного разборного, на 3-х стрипах сорбированы НCV-core-Ag, на 3-х стрипах - НCV-NS3-Ag, на 3-х стрипах - НCV-NS4-Ag и на 3-х стрипах - НCV-NS5-Ag	3 шт. x 4 стрипа или 1 планшет
Конъюгат (концентрат x 11) - моноклональные антитела мыши к иммуноглобулинам М человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
К+ (контрольный положительный образец) - сыворотка крови человека, содержащая антитела класса М к структурным и неструктурным белкам вируса гепатита С (анти-НСV), и не содержащая HBsAg, антитела и антиген к ВИЧ-1,2, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
К- (контрольный отрицательный образец) - сыворотка крови человека, не содержащая HBsAg, антитела и антиген к ВИЧ-1,2, и вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 3,0 мл
РРК (раствор для разведения конъюгата) - прозрачная или слегка опалесцирующая желтого или светло-желтого цвета жидкость, допустимо образование аморфного осадка, при встряхивании распадающегося и приводящего к помутнению раствора.	1 флакон 13,0 мл
БР (блок-раствор для рабочего разведения сывороток) – непрозрачная голубого цвета жидкость, допустимо образование аморфного осадка, при встряхивании распадающегося и приводящего к помутнению раствора.	1 флакон 11,0 мл

Промывочный раствор (концентрат x 25). 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
СБ - субстратный буферный раствор, содержащий лимонную кислоту, ацетат натрия, раствор водорода перекиси, рН 4,2. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 15,0 мл
Хромоген ТМБ - раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндегидрохлорид. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 1,5 мл
Стоп-реагент - раствор серной кислоты 0,75 моль/л. Прозрачная, бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл

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

Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетами или защитная пленка для ИФА планшетов	1 шт.
	Рамка для срипов	1 шт.
	Одноразовые наконечники	16 шт.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.
	Пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или пакет полиэтиленовый с замком zip-lock.	1 шт.

III. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с температурой от 18 до 24 °С.
- Нельзя использовать реагенты с истекшим сроком годности.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий и смешивать их в процессе приготовления растворов.
- Перед использованием все реагенты выдержать при температуре от 18 до 24 °С 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 конъюгата.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта или предпочтительно применять посуду одноразового использования.
- Посуду для работы с субстратной смесью (ванночки, флаконы и т.д.) в случае повторного использования необходимо сразу после работы промыть 70 % раствором этилового спирта, а затем водой дистиллированной.
- Иммуносорбент допускается хранить в промежутках между отдельными операциями не более 10 мин (нельзя допускать высыхания лунок планшета).
- Ферментативная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгата или субстрата.
- Необходимо использовать чистый 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 дистиллированную (по ФС-42-2619-97).
- Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

IV. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики “in vitro”.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении контрольного отрицательного образца (К-) были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1, антител к вирусу гепатита С и антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении контрольного положительного образца (К+) были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1, антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-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 любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спец. одежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Избегайте распыливания образцов или растворов, содержащих образцы. При распыливании немедленно дезактивируйте поверхность 3 % раствором хлорамина Б.
- Избегайте контакта субстратного буфера, хромогена, стоп-реагента с кожей и слизистыми.
- После проведения ферментной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализационную трубу. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дез. средства. Твёрдые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.



✘ некоторые реагенты содержит 0,05 % Проклин 300. Проклин 300 0,05 % - раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промойте область контакта большим количеством мыла и воды.

V. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМОЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Вода дистиллированная.
- 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 ($37,0 \pm 0,5$) °С.
- Автоматический микропланшетный вошер.
- Градуированные цилиндры: 25 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Микропланшетный ридер с возможностью измерения оптической плотности (ОП) при фильтрах 450 нм и 620-700 нм.
- При проведении анализа на автоматическом анализаторе для ИФА на планшетах - автоматический анализатор открытого типа (например «TECAN Freedom EVOlyser» производства фирмы «TECAN»).

V. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови должен проводиться в соответствии с текущей практикой. В качестве исследуемых образцов может быть использована сыворотка (плазма) 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! Отобранные образцы хранить не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). 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.

VI. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты готовые к применению:

- К- - контрольный отрицательный образец
- К+ - контрольный положительный образец
- РРК - раствор для разведения конъюгата
- БР - блок раствор
- Стоп-реагент

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

Иммуносорбент. Каждый планшет, состоящий из 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 1 мес при температуре от 2 до 8 °С, при условии, что пакет герметично закрыт с помощью скрепки. Силикагель удалять из пакета нельзя.

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. Приготовленный рабочий промывочный раствор стабилен в течение 3 сут при хранении при температуре от 2 до 8 °С в герметично закупоренном флаконе.

Рабочий раствор конъюгата. Готовить перед использованием. Необходимое количество РРК перенести в чистую емкость, добавить соответствующее количество тщательно перемешанного концентрата конъюгата (см. табл. № 2 и 3). Полученный раствор осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Рабочий раствор конъюгата стабилен не более 6 ч в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

Субстратная смесь (СС). Готовить перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (см. табл. № 2 и 3), тщательно перемешать до полного растворения. Допустимо хранение СС не более 10 ч в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С в химически чистых флаконах или специальной емкости, предназначенной для постановки ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

3. Хранение неиспользованных реагентов

После вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными реагенты допускается хранить: ПР (концентрат х 25), К+, К-, РРК, конъюгат, БР, СБ, ТМБ, стоп-реагент - во флаконах, закрытых винтовыми крышками, в течение срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С; иммуносорбент после вскрытия пакета - в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц. х 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. х 11) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
4	16,0	384,0	0,4	4,0	0,4	4,0
8	32,0	768,0	0,8	8,0	0,8	8,0
12 (целый планшет)	50,0	1200,0	1,2	12,0	1,2	12,0

Проведение ИФА

1. В лунки планшета 1-4 ряда А пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К+, в лунки 1-4 рядов В и С внести по 100 мкл К-. В остальные лунки внести по 80 мкл блок-раствора и по 20 мкл исследуемых образцов сывороток. Каждый образец сыворотки внести в 4 лунки иммуносорбента: с HCV-core-Ag, с HCV-NS3-Ag, с HCV-NS4-Ag, с HCV-NS5-Ag (лунки 1-4, 5-8, 9-12 в соответствии с приведённой схемой постановки ИФА). Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краю планшета. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате в течение 30 мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

Схема постановки ИФА

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	core	NS3	NS4	NS5	core	NS3	NS4	NS5	core	NS3	NS4	NS5
A	K+	K+	K+	K+	6	6	6	6	14	14	14	14
B	K-	K-	K-	K-	7	7	7	7	15	15	15	15
C	K-	K-	K-	K-	8	8	8	8	16	16	16	16
D	1	1	1	1	9	9	9	9	17	17	17	17
E	2	2	2	2	10	10	10	10	18	18	18	18
F	3	3	3	3	11	11	11	11	19	19	19	19
G	4	4	4	4	12	12	12	12	20	20	20	20
H	5	5	5	5	13	13	13	13	21	21	21	21

2. 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 (от 380 до 400 мкл в лунку), выдерживая 40 с и удаляя промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала.
3. Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата и покрытый крышкой или защитной пленкой планшет выдержать в термостате 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, после чего планшет промыть 4 раза, как указано в п. 2.
4. Во все лунки планшета внести по 100 мкл СС и выдержать планшет 30 мин при температуре от 18 до 24 $^\circ\text{C}$ в защищенном от света месте.
5. Реакцию остановить добавлением в лунки по 50 мкл стоп-реагента и провести учет результатов.
6. Проведение анализа в автоматическом режиме на автоматическом анализаторе типа «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN», Швейцария (возможна постановка на других моделях ИФА - анализаторов открытого типа).

Таблица 3

Расход реагентов тест-системы на один планшет при постановке ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Субстратная смесь	
	ПР (конц. x25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. x 11) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
12 (целый планшет)	50,0	1200,0	1,2	12,0	1,2	12,0

1. Задают программу проведения ИФА и включают анализатор.
2. Приготовленный рабочий промывочный раствор заливают в предназначенную для него емкость (входящую в комплект к ИФА-анализатору), остальные рабочие растворы и реагенты помещают в специальные контейнеры или емкости. Флаконы с контрольными образцами K+ и K-, и флаконы или пробирки с образцами исследуемых сывороток в объеме не менее 300 мкл

устанавливают в соответствующие штативы анализатора. В анализатор помещают необходимое количество планшетов. Далее постановку проводить в соответствии с инструкцией по применению ИФА-анализатора и программой проведения ИФА.

3. По окончании анализа прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов К+ и К-.
4. Реакцию учитывают, если среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с К+ не менее 1,0, а среднее значение ОП растворов в лунках с К- - не более 0,2. Далее учет результатов проводить аналогично разделу IX.

IX. РЕЗУЛЬТАТЫ

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 учитывают, если среднее значение ОП в лунках с К+ не менее 1,0, а среднее значение ОП в лунках с К- не более 0,2*.

Оценку результатов анализа сывороток на анти-НСV-core-Ag, анти-НСV- анти-NS3-Ag, анти-НСV-NS4-Ag, анти-НСV-NS5-Ag проводят отдельно.

Результаты анализа следует считать положительными, если значение ОП образца в лунке хотя бы с одним из сорбированных антигенов превышает соответствующее критическое значение ОП (ОП крит.) на 20 % и более.

Результаты анализа следует считать неопределенными, если значение ОП образца в лунке с одним или более НCV-Ag равно значению ОП крит. или превышает значение ОП крит. менее чем на 20 %. Такие образцы рекомендуется исследовать в ПЦР, а через 2-3 недели от момента первого забора крови повторно исследовать сыворотки на анти-НСV в ИФА.

ОП крит. рассчитывать по формулам:

ОП крит. core-Ag = ср. знач. ОП К- (core) + A,

ОП крит. NS3-Ag = ср. знач. ОП К- (NS3) + B,

ОП крит. NS4-Ag = ср. знач. ОП К- (NS4) + C,

ОП крит. NS5-Ag = ср. знач. ОП К- (NS5) + D.

где A, B, C и D - коэффициенты, определяемые методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе, величину которых указывают для каждой серии в инструкции по применению, вкладываемой в коробку с набором и в паспорте на серию данного препарата**.

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

** - «Для серии № _____ величина коэффициента A _____, B _____, C _____, D _____».

X. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности - 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.



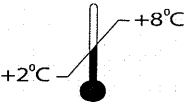

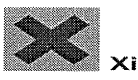
Хранение - в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование - при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование от 9 до 20 °С и не более 10 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу 119002, Россия, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел.: (499) 241-39-22, факс: (499) 241-92-38 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, Нижний Новгород, ул. Яблонева, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

ХII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ на внутренней упаковке

	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Содержит раздражающее вещество

Директор ООО
«Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»
по производству



В. К. Пименов