НАУЧНО–ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

REF **С-1952** Σ **96**

REF **С-1953** Σ **192**

REF **С-1954** Σ **480**

И Н С Т Р У К Ц И Я
по применению набора реагентов «ДС-ИФА-HCV-АГАТ» Тест-система иммуноферментная для одновременного выявления антигена и антител к вирусу гепатита С, набор диагностический

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

Содержание

I. Назначение 3
II. Состав набора 3
III. Аналитические и диагностические характеристики набора 5
IV. Меры предосторожности 7
V. Инструкции по безопасности 8
VI. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемые с набором реагентов 10
VII. Отбор и подготовка образцов 10
VIII. Подготовка реагентов 10
IX. Проведение анализа 12
X. Учет результатов 16
XI. Ограничения теста 16
XII. Срок годности. Условия хранения и транспортирования 17
XIII. Объяснение символов 17
XIV. Список литературы 18
Приложение 1 19
Приложение 2 20

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

Набор реагентов выпускается в трех комплектах:
комплект № 1 рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного использования набора или для одновременной постановки 96 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа;
комплект № 2 рассчитан на проведение 192 (два разборных планшета) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного использования набора или для одновременной постановки 192 (96 х 2) определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа;
комплект № 3 рассчитан на проведение 480 (пять разборных планшетов) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного использования набора или для одновременной постановки 480 (96 х 5) определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-HCV-АГАТ» - тест-система иммуноферментная для одновременного выявления антигена и антител к вирусу гепатита С в сыворотке (плазме) крови человека. Рекомендуется для первичной лабораторной диагностики гепатита С и обследования доноров крови.

II. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ДС-ИФА-HCV-АГАТ»

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, и моноклональные антитела к антигену вируса гепатита С.	1 планшет	2 планшета	5 планшетов
Конъюгат-1, жидкий – моноклональные антитела к антигену вируса гепатита С, конъюгированные с биотином. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость, допустимо наличие аморфных образований.	1 флакон 0,8 мл	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 4,0 мл
Конъюгат-2, жидкий – смесь стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена и моноклональных антител к иммуноглобулинам человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 3,0 мл	2 флакона по 3,0 мл

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

К+$_{АТ}$ (контрольный положительный образец антител), жидкий – сыворотка крови человека, содержащая антитела к вирусу гепатита С, не содержащая антиген вируса гепатита С, HBsAg, р24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1,2, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая оранжевого цвета жидкость.	1 флакон 1,0 мл	1 флакон 2,0 мл	1 флакон 4,0 мл
К+$_{АГ}$ (контрольный положительный образец антигена), жидкий - очищенный рекомбинантный антиген вируса гепатита С, не содержащий антитела к вирусу гепатита С, HBsAg, р24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1,2, инактивированный. Прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость.	1 флакон 1,0 мл	1 флакон 2,0 мл	2 флакона по 2,0 мл
К- (контрольный отрицательный образец), жидкий - сыворотка крови человека, не содержащая антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ-1,2, р24 ВИЧ-1, HBsAg; инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 2,0 мл	2 флакона по 2,0 мл	3 флакона по 2,0 мл
РРК-1 - раствор для разведения конъюгата-1. Прозрачная или опалесцирующая оранжевого цвета жидкость, допустимо наличие осадка или аморфных образований, исчезающих при взбалтывании.	1 флакон 8,0 мл	1 флакон 15,0 мл	2 флакона по 20,0 мл
РРК-2 - раствор для разведения конъюгата-2. Прозрачная или слегка опалесцирующая желтого цвета жидкость, допустимо образование осадка.	1 флакон 15,0 мл	1 флакон 30,0 мл	2 флакона по 30,0мл или 1 флакон 60,0 мл
ПР – 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, содержащий лимонную кислоту, ацетат натрия, раствор перекиси водорода. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 15,0 мл	1 флакон 25,0 мл	2 флакона по 50,0 мл
ТМБ - раствор, содержащий 3,3′,5,5′-тетраметилбензидин-дегидрохлорид. Прозрачная бесцветная или пурпурно-розового цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 2,5 мл	2 флакона по 3,5 мл
Стоп-реагент - раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл	2 флакона по 25,0 мл	2 флакона по 50,0 мл или 1 флакон 100,0 мл

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

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами. Имеется цветовая кодировка реагентов. Набор упакован в коробку картонную, куда вкладывается инструкция по применению.

		Комплект 1	Комплект 2	Комплект 3
Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка для планшетов	1 шт.	2 шт.	5 шт.
		2 шт.	4 шт.	10 шт.
	Одноразовые наконечники	16 шт.	32 шт.	80 шт.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.	4 шт.	10 шт.
	Пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или полиэтиленовый пакет с замком zip-lock.	1 шт.	2 шт.	3 шт.

III. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Аналитическая чувствительность

Для оценки чувствительности набора реагентов «ДС-ИФА-HCV-АГАТ» по выявлению антигена вируса гепатита С были использованы различные концентрации рекомбинантного антигена вируса гепатита С (ООО «НПО «Диагностические системы», Россия). Показатель чувствительности тест-системы соответствует наименьшему количеству антигена, которое определяется данной тест-системой.

Предел чувствительности тест-системы при определении антигена вируса гепатита С - 1,0 нг/мл.

Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов «ДС-ИФА-HCV-АГАТ» оценивалась при тестировании:

1. Образцов сывороток крови от 606 пациентов, инфицированных гепатитом С - 100%.

2. 19 коммерческих сероконверсионных панелей сывороток крови человека, (SeraCareLife Sciences, Inc., США; Zeptometrix, США). Результаты представлены в таблице 2.

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

Таблица 2

Панель	Генотип*	Дни до выявления HCV с первой кроводачи			Изменение серологического окна для ДС-ИФА-HCV-АГАТ в сравнении с тестом на анти-HCV, дни
		HCV-PCR*	Anti-HCV Ortho HCV 3.0*	ДС-ИФА-HCV-АГАТ**	
9041	ND	24	62	24	-38
9044	ND	0	25	0	-25
9045	ND	0	41	0	-41
9047	ND	0	28	0	-28
6212	1	0	23	32	9
6213	ND	15	43	30	-13
6214	1	0	32	0	-32
6215	1a	0	20	0	-20
6222	ND	17	40	17	-23
PHV901	1a	65	97	0	-97
PHV917	2b	20	85	20	-65
10003	3	26	All negative	30	
10008	1a/1b	9	All negative	15	
10016	2	43	All negative	47	
10020	1a	25	All negative	25	
10021	1a	35	All negative	37	
10023	1a	39	All negative	42	
10029	1	48	All negative	48	
10051	1b	36	All negative	38	
Среднее, дни, 11 панелей		13	45	11	-34
Среднее, дни, 19 панелей		21		21	

*- результаты из информационных листов на сероконверсионные панели
** - результаты НПО «Диагностические системы»
ND – не определен

По 11 панелям «ДС-ИФА-HCV-АГАТ» выявляет HCV-инфекцию в среднем на 34 дня ранее, чем тест для выявления только антител к HCV.

3. Было протестировано 58 сывороток крови с известным генотипом HCV. Распределение по генотипам представлено в таблице 3:

Таблица 3

Генотип	1	1a	1b	2	2a	2b	2c	3	3a
Количество образцов	3	7	25	2	1	1	3	8	8

Все данные образцы были позитивными в «ДС-ИФА-HCV-АГАТ»: 100% чувствительность.

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

Специфичность

Специфичность по результатам исследования на случайной выборке в количестве 5005 доноров составила 99,81%. При исследовании выборки донорских сывороток, состоящей из 1466 образцов, полученный показатель специфичности составил 99,86%.

Была протестирована панель из 520 образцов сывороток крови пациентов, состоящая из:

- 200 образцов сывороток крови, содержащих антитела к возбудителям гепатита А, В, ВИЧ1,2, герпеса, сифилиса, хламидиоза;
- 20 образцов сывороток крови, содержащих ревматоидный фактор;
- 300 образцов сывороток крови, взятых от беременных женщин.

Специфичность набора составила – 99,5%.

Точность

Внутрисерийная воспроизводимость анализа была оценена при тестировании 3 положительных образцов в 8 повторах на наборах реагентов «ДС-ИФА-HCV-АГАТ» одной и той же серии. Коэффициент вариации не превышал 6,9%.

Межсерийная воспроизводимость анализа была оценена при тестировании 3 положительных образцов в течение 3 дней 2 разными операторами. Коэффициент вариации не превышал 9,5%.

IV. 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 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;
  - другие реагенты также могут быть взаимозаменяемыми для постановки в большинстве тест-систем производства ООО «НПО «Диагностические системы».
  - за более детальной информацией относительно других реагентов обратитесь в нашу службу поддержки пользователей по телефону бесплатной линии 8-800-555-0300 (доб 7606, 7655) или по E-mail: info@npods.ru.
- Перед использованием все реагенты выдержать при температуре от 18 до 24 °С в течение 30 мин.

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

- Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить тест в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.
- Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной. Посуду для работы с субстратной смесью (ванночки, флаконы и т.д.) в случае повторного использования необходимо сразу после работы промыть водой дистиллированной, затем 70% раствором этилового спирта и ополоснуть водой дистиллированной.
- Иммуносорбент допускается хранить в промежутках между отдельными операциями не более 10 мин (нельзя допускать высыхания лунок планшета).
- Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстрата.
- Необходимо использовать новый наконечник для каждого образца.
- Промывка лунок - важный этап в данной процедуре: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполняются, 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 высокой температуры или прямого солнечного света.

V. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для диагностики “in vitro”.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении К-, были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к гепатиту С и ВИЧ-1,2.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении $К+_{АТ}$, были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к ВИЧ-1,2.

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

- При работе с реагентами набора (К-, $К+_{АГ}$, $К+_{АТ}$) 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 необходимо 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.
- 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 ферментной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или 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 погружением в 6% раствор перекиси водорода с 0,5% синтетического моющего средства или в 3% раствор хлорамина Б. Длительность дезинфекции – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дезинфицирующего средства. Твёрдые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кГс/см^2 (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кГс/см^2 (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 содержат 0,1% Проклин 300. Проклин 300 0,1% - раздражающее вещество. Может вызвать сенсибилизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

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

VI. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ 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.
- Термостатируемый шейкер (37,0 ± 0,5) °С.
- Термоинкубатор микропланшетный (37,0 ± 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 620-680 нм.
- При проведении анализа на автоматическом анализаторе для ИФА на планшетах - автоматический анализатор открытого типа (например «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN»)
- 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.ru.

VII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови должен производиться в соответствии с надлежащей практикой методом венопункции. **Для анализа использовать неразведенную сыворотку или плазму**. Образцы, содержащие видимые частицы следует осветлить центрифугированием, т.к. частицы фибрина и агрегаты могут привести к ложно-положительным результатам. Образцы с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией могут дать неправильный результат. Образцы можно хранить в соответствии с требованиями существующих нормативных документов. Сыворотку (плазму) нельзя размораживать при температуре выше 40 °С из-за нестабильности антигена вируса гепатита С. Недопустимо повторное замораживание-размораживание образцов. Следует отметить нестабильность кор-антигена HCV при хранении даже при – 40 °С[8]. Поэтому образцы с вероятным ранним инфицированием HCV желательно исследовать как можно раньше после забора крови.

VIII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:

- **К+$_{АТ}$** - контрольный положительный образец антител;
- **К+$_{АГ}$** - контрольный положительный образец антигена;
- **К-** - контрольный отрицательный образец;
- **Стоп-реагент**.

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

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

- **Иммуносорбент.** Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет и вынуть планшет. Взять необходимое количество стрипов или лунок. Неиспользованные стрипы без рамки поместить обратно в пакет (не удаляя силикагель!) и тщательно герметизировать. Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета или поместить фольгированный пакет со стрипами в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock. После вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 6 мес. при температуре от 2 до 8 °С.
- **Рабочий промывочный раствор (ПР).** Содержимое флакона с концентратом (х 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимый объем концентрата (х 25) промывочного раствора развести соответствующим объемом воды дистиллированной (см. табл. 4). Полученный раствор тщательно перемешать. Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут. при температуре от 18 до 24 °С или 28 сут. при температуре от 2 до 8 °С.
- **Рабочий раствор конъюгата-1.** Необходимое количество РРК-1 перенести в чистый флакон, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата-1 (концентрат х 11) (см. табл. 4) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Выдержать рабочий раствор конъюгата-1 не менее 10 мин при комнатной температуре перед использованием. Хранить не более 8 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в чистых флаконах.
- **Рабочий раствор конъюгата-2.** Необходимое количество РРК-2 перенести в чистый флакон, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата-2 (концентрат х 11) (см. табл. 4) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Выдержать рабочий раствор конъюгата-2 не менее 10 мин при комнатной температуре перед использованием. Хранить не более 8 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в чистых флаконах.
- **Субстратная смесь (СС).** Развести необходимый объем ТМБ соответствующим объемом СБ (см. табл. 4). Тщательно перемешать до полного растворения. Субстратная смесь должна готовиться перед использованием. Хранить не более 8 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в чистых флаконах.

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

3. Хранение неиспользованных реагентов.

После вскрытия флаконов и пакета с иммуносорбентом, оставшиеся не использованными реагенты: иммуносорбент - хранить не более 6 мес; $К+_{АГ}$ - хранить не более 3 мес; конъюгат-1 (концентрат х 11), конъюгат-2 (концентрат х 11), $К+_{АТ}$, К-, РРК-1, РРК-2, ПР (концентрат х 25), СБ, ТМБ, стоп-реагент хранить во флаконах, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

IX. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при температуре от 18 до 24 °С.

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблице 4.

Таблица 4

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

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор (ПР)		Рабочий раствор конъюгата-1		Рабочий раствор конъюгата-2		СС	
	ПР (х 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат-1 (х11) (мл)	РРК-1 (мл)	Конъюгат-2 (х11) (мл)	РРК-2 (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
1	3,0	72,0	0,05	0,5	0,1	1,0	0,1	1,0
2	6,0	144,0	0,10	1,0	0,2	2,0	0,2	2,0
3	9,0	216,0	0,15	1,5	0,3	3,0	0,3	3,0
4	12,0	288,0	0,20	2,0	0,4	4,0	0,4	4,0
5	15,0	360,0	0,25	2,5	0,5	5,0	0,5	5,0
6	18,0	432,0	0,30	3,0	0,6	6, 0	0,6	6,0
7	21,0	504,0	0,35	3,5	0,7	7,0	0,7	7,0
8	24,0	576,0	0,40	4,0	0,8	8,0	0,8	8,0
9	27,0	648,0	0,45	4,5	0,9	9,0	0,9	9,0
10	30,0	720,0	0,50	5,0	1,0	10,0	1,0	10,0
11	33,0	792,0	0,55	5,5	1,1	11,0	1,1	11,0
12	40,0	960,0	0,60	6,0	1,2	12,0	1,2	12,0

Перед использованием иммуносорбент не промывать!

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

Процедура 1 - термостатируемый шейкер:

1. Во все лунки планшета внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата-1.

2. В зависимости от количества используемых стрипов рекомендуется внести в лунки 50 мкл контрольных образцов следующим образом:

1-2 стрипа – $К+_{АТ}$ -1 лунка, $К+_{АГ}$ -1 лунка, К- - 2 лунки;

3 стрипа и более – $К+_{АТ}$ -1 лунка, $К+_{АГ}$ - 1 лунка, К- - 3 лунки.

В остальные лунки внести по 50 мкл неразведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Время внесения образцов не должно превышать 15 мин. При внесении образцов оранжевый цвет рабочего раствора конъюгата-1 должен измениться на розово-малиновый. При внесении образцов с кислым pH оранжевый цвет рабочего раствора конъюгата-1 может измениться на желтый. Некоторые образцы сывороток (плазм), имеющих pH близкий к нейтральному, после внесения цвет конъюгата-1 не меняют.

3. Планшет инкубировать 30 мин в термошейкере при 500 об/мин и температуре (37,0 ± 0,5) °С.

4. Содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дез. раствором с помощью промывочного устройства, планшет промыть 4 раза рабочим ПР, наполняя лунки планшета до краёв (не менее 350 мкл в лунку), выдержать 10 с, затем удалить промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала. Рекомендуется использование автоматического микропланшетного вошера. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.

5. Во все лунки микропланшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата-2.

6. Планшет инкубировать 30 мин в термошейкере при 500 об/мин и температуре (37,0 ± 0,5) °С.

7. Содержимое лунок аккуратно удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала с помощью промывочного устройства, планшет промыть 4 раза рабочим ПР, как указано в п 4.

8. Во все лунки планшета внести по 100 мкл СС и выдержать планшет в защищенном от света месте в течение 20 мин при от 18 до 24 °С или в течение 15 мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

9. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 150 мкл стоп-реагента и провести учет результатов через 2-3 минуты в течение 15 минут после остановки реакции.

Далее см. раздел **X.**

Схема проведения ИФА приведена в Приложении 2.

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

Процедура 2 - инкубатор микропланшетный:

1. Во все лунки планшета внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата-1.

2. В зависимости от количества используемых стрипов рекомендуется внести в лунки 50 мкл контрольных образцов следующим образом:

1-2 стрипа – К+$_{АТ}$ -1 лунка, К+$_{АГ}$ -1 лунка, К- - 2 лунки;

3 стрипа и более – К+$_{АТ}$ -1 лунка, К+$_{АГ}$ - 1 лунка, К- - 3 лунки.

В остальные лунки внести по 50 мкл неразведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Содержимое лунок тщательно перемешать пипетированием. Время внесения образцов не должно превышать 15 мин. При внесении образцов оранжевый цвет рабочего раствора конъюгата-1 должен измениться на розово-малиновый. При внесении образцов с кислым pH оранжевый цвет рабочего раствора конъюгата-1 может измениться на желтый. Некоторые образцы сывороток (плазм), имеющих pH близкий к нейтральному, после внесения цвет конъюгата-1 не меняют.

3. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать 60 мин в инкубаторе микропланшетном при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

4. Содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дез. раствором с помощью промывочного устройства, планшет промыть 4 раза рабочим ПР, наполняя лунки планшета до краёв (не менее 350 мкл в лунку), выдержать 10 с, затем удалить промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала. Рекомендуется использование автоматического микропланшетного вошера. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.

5. Во все лунки микропланшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата-2.

6. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать 30 мин в инкубаторе микропланшетном при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

7. Далее постановку проводить аналогично п.7-9 Процедуры 1.

Далее см. раздел **X.**

Схема проведения ИФА приведена в Приложении 2.

10. Проведение анализа в автоматическом режиме на анализаторе открытого типа «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN», Швейцария (возможна постановка на других моделях ИФА-анализаторах открытого типа).

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

Таблица 5

Расход реагентов набора на один планшет при постановке ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа

12 стрипов (целый планшет)	**Рабочий промывочный раствор (ПР)**		**Рабочий раствор конъюгата-1**		**Рабочий раствор конъюгата-2**		**СС**	
	ПР (х 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат-1 (х11) (мл)	РРК-1 (мл)	Конъюгат-2 (х11) (мл)	РРК-2 (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
	40,0	960,0	0,60	6,0	1,2	12,0	1,2	12,0

10.1. Задать программу проведения ИФА и включить анализатор.

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

10.3. По окончании анализа прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов $К+_{АТ}$, $К+_{АГ}$ и К-.

10.4. Далее учет результатов проводить аналогично п. **X**.

11. Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест-системы «ДС-ИФА-HCV-АГАТ» на автоматических ИФА-анализаторах:

11.1. Контроль внесения коньюгата-1 и образцов сыворотки рекомендуется проводить при длине волны 450 нм, критерий: ОП > 0,800.

11.2. Контроль внесения коньюгата-2 рекомендуется проводить при длине волны 450 нм, критерий: ОП > 0,200.

11.3. Контроль внесения СС рекомендуется проводить при длине волны 405 нм, критерий: ОП > 0,050.

Протоколы постановки тест-системы на автоматических ИФА анализаторах предоставляются ООО «НПО «Диагностические системы» по запросу. Тел. 8-800-555-0300 (звонок по России бесплатный).

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

X. 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.

Наличие определяемого антигена вируса гепатита С или антител к вирусу гепатита С оценивается сравнением оптической плотности (ОП), измеряемой для каждого образца, с расчетной величиной ОП критической.

Результаты анализа учитывать, если среднее значение ОП в 2 или 3 лунках с К- (ОП К-ср) не более 0,2, значение ОП в лунках с $К+_{АТ}$ и с $К+_{АГ}$ - не менее 0,6.

ОП крит. рассчитывать по формуле:

ОП крит. = ОП К- ср + А (А=0,200),

где **А** – коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе.

Исследуемые образцы расценивать как положительные: если ОП ≥ ОПкрит.

Исследуемые образцы расценивать как отрицательные: если ОП < ОПкрит.

Образцы, значения ОП которых равны или превышают ОПкрит., должны быть исследованы повторно в 2 лунках. При получении положительного результата хотя бы в одной из 2-х лунок образцы расценивать как положительные.

XI. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

- **Для анализа следует использовать только неразведенные образцы сыворотки или плазмы.**
- **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 тестах – ИФА, иммуноблоттинге или ПЦР[7].**
- **Различия в результатах тестирования различными тестами образцов от пациентов, зараженных вирусом гепатита С, могут быть вызваны отличиями в иммунологических реакциях в зависимости от вида используемых антигенов[2].**
- **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.**

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

XII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Набор следует хранить до даты, указанной на упаковке.

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 25 °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» 603093 Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.ru, www.npods.ru.

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

1. Рекламируемого набора;
2. Всех образцов кроводач пациента;
3. Протоколов исследований с использованием других методов с указанием серии, сроков годности и фамилией оператора;
4. Протоколов исследований с использованием референтных тестов с указанием серии, сроков годности и фамилии оператора.

XIII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

CE	CE маркировка (Европейская директива 98/79/CE по ИВД медицинским устройствам)
IVD	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Производитель
REF	Каталожный номер
Σ	Количество определений
LOT	Номер партии (серии)
+8°C +2°C	Температурные пределы хранения
EXP.	Срок годности дата/месяц/год
	Используйте инструкцию по применению
Xi	Содержит раздражающее вещество

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

XIV. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

См. Приложение 1 к данной инструкции.

Дополнительная информация в соответствии с ГОСТ Р 51088-2013

- «Набор предназначен для профессионального использования в клинической лабораторной диагностике специально обученным персоналом. При работе с набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования к безопасности»».
- «Реагенты набора не содержат вредных веществ в опасных концентрациях, за исключением реагентов, обозначенных символом «Внимание». При попадании на кожу или слизистые немедленно промыть большим количеством воды».
- Расшифровка символов по ГОСТ Р 15223-1-2014 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Общие требования».

 – Дата изготовления (YYYY-MM), символ 5.1.3;

 – Срок годности (дата истечения срока годности в формате YYYY-MM-DD), символ 5.1.4 (взамен символа EXP.);

 – Не допускать воздействия солнечного света, символ 5.3.2;

 – Беречь от влаги, символ 5.3.4;

 – Внимание, символ 5.4.4;

 – Содержит раздражающее вещество (символ исключен).

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

Приложение 1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. Санкт-Петербург, 1998.-С.201-245

2. 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.

3. 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.

4. Colin C., Lanoir D., Tauzet S. et.al. Sensibility and apecificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of literature// J.Viral Hepatitis. – 2001.-V.8-p.87-95.

5. 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/ - Copengagen, Denmark, 2005.-P.203.

6. 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 Infectious Diseases/ - Vienna, 2010.-P.118.

7. 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. – Milan, May 7-10, 2011. – P.2235.

8. Evaluation of MONOLISA HCV Ag-Ab ULTRA. MiDAS, London 2006:1-19.

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

Приложение 2

СХЕМА АНАЛИЗА

1	**Внести**	По 50 мкл конъюгата-1 во все лунки
2	**Внести**	По 50 мкл $К+_{АТ,}$ $К+_{АГ,}$ К- и исследуемых образцов сывороток
3	**Инкубировать**	**Процедура 1:** 30 мин, (37,0 ± 0,5), шейкер **Процедура 2:** 60 мин, (37,0 ± 0,5), термостат
4	**Промыть планшет**	4 раза, не менее 350 мкл рабочего промывочного раствора
5	**Внести**	По 100 мкл конъюгата-2 во все лунки
6	**Инкубировать**	**Процедура 1:** 30 мин, (37,0 ± 0,5), шейкер **Процедура 2:** 30 мин, (37,0 ± 0,5), термостат
7	**Промыть планшет**	4 раза, не менее 350 мкл рабочего промывочного раствора
8	**Внести**	По 100 мкл СС
9	**Инкубировать**	20 мин, 18-24 °С в темноте или 15 мин, (37,0 ± 0,5) °С в темноте
10	**Внести**	По 150 мкл стоп-реагента
11	**Учет результатов**	450 нм/620-680 нм или 450 нм

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