

**УТВЕРЖДАЮ**

**Заместитель**

**генерального директора**

**ООО «Научно-производственное  
объединение «Диагностические  
системы»**



**О. Н. Шлюнидин**

**2010 г.**


## **ИНСТРУКЦИЯ**

**по применению набора реагентов**

**«ИФА-АНТИ-НСVс-М»**

**Тест - система иммуноферментная для выявления антител  
класса Ig M к core-антигену вируса гепатита С**

СОГЛАСОВАНО  
Директор ФГБУ  
«ГИСК им. Л.А. Тарасевича»  
Минздравсопразвтия России



*[Handwritten signature]*  
И.В. Борисевич  
2010 г.

## Содержание

I. Назначение.....	3
II. Состав набора .....	3
III. Меры предосторожности.....	4
IV. Инструкции по безопасности.....	4
V. Необходимые материалы и оборудование, не предоставляемые 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.....	9

**Набор реагентов выпускается в одном комплекте.**

Набор рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для одновременной постановки 96 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

**I. НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор реагентов "ИФА-АНТИ-НСVc-М" предназначен для выявления антител класса IgM к core-антигену вируса гепатита С в сыворотке (плазме) крови человека.

**II. СОСТАВ НАБОРА "ИФА-АНТИ-НСVc-М"**

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - полистироловый разборный планшет с прозрачными бесцветными лунками, в которых сорбирована смесь рекомбинантных core-антигенов вируса гепатита С.	1 планшет
Конъюгат (концентрат x 11), жидкий – моноклональные антитела мыши к иммуноглобулину класса IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1,5 мл 1 флакон
К+ (контрольный положительный образец) - сыворотка крови человека, содержащая антитела класса IgM к вирусу гепатита С (анти-НСVc-М), не содержащая HBsAg и антитела к ВИЧ-1,2, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость.	1,5 мл 1 флакон
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.	3,0 мл 1 флакон
РРК (раствор для разведения конъюгата) - прозрачная или слегка опалесцирующая жёлтого или светло - желтого цвета жидкость, допустимо образование аморфного осадка, при встряхивании распадающегося и приводящего к помутнению раствора.	12,5 мл 1 флакон
БР (блок-раствор для рабочего разведения сывороток) - непрозрачная голубого цвета жидкость, допустимо образование аморфного осадка, при встряхивании распадающегося и приводящего к помутнению раствора.	12,5 мл 1 флакон
ПР (концентрат x 25) - промывочный раствор. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании.	50,0 мл 1 флакон
СБ - субстратный буферный раствор, содержащий лимонную кислоту, ацетат натрия, раствор водорода перекиси, рН 4,2. Прозрачная бесцветная жидкость.	15,0 мл 1 флакон
Хромоген ТМБ - раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндегидрохлорид. Прозрачная бесцветная жидкость.	1,5 мл 1 флакон
Стоп-реагент - раствор серной кислоты 0,75 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	25,0 мл 1 флакон

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

Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам	1 шт.
	или защитная пленка для ИФА планшетов	2 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; предпочтительно применение материалов одноразового использования.
- Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной. Многоцветные ванночки для автоматических анализаторов необходимо сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной. Затем промыть 70 % раствором этилового спирта и снова ополоснуть 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 К- были протестированы и определены неактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к вирусу гепатита С и ВИЧ-1,2.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении К+ были протестированы и определены неактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к ВИЧ-1,2.

- При работе с реагентами набора (K-, K+) 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 лабораторную одежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезактивировать 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 любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в сточную 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 (СМС) 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/см<sup>2</sup> (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/см<sup>2</sup> (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.



- **Xi** Некоторые реагенты содержат 0,05 % Проклин 300. Проклин 300 0,05 % - раздражающее вещество. Может вызвать сенсибилизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промойте область контакта большим количеством мыла и воды.

## **V. 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.
- Инкубатор микропланшетный или термостатируемый шейкер (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 EVOlyser» производства фирмы «TECAN»).

## VI. 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.

## VII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

### 1. Реагенты готовые к применению:

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

### 2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

**Иммуносорбент.** Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет и вынуть планшет. Взять нужное количество стрипов. Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать (не удаляя осушитель!). Для этого поместить вскрытый пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или край пакета с иммуносорбентом свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета.

**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.

**Рабочий раствор конъюгата.** Готовить перед использованием. Необходимое количество РРК перенести в чистую емкость, добавить соответствующее количество тщательно перемешанного конъюгата (концентрат x 11) (см. табл. № 2 и 3). Полученный раствор осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Рабочий раствор конъюгата стабилен в течение 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 x 25), К+, К-, РРК, конъюгат (концентрат x 11), 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 6 мес при температуре от 2 до 8 °С.

### VIII. 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 № 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. x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. x 11) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
1	4,0	96,0	0,10	1,0	0,10	1,0
2	8,0	192,0	0,20	2,0	0,20	2,0
3	12,0	288,0	0,30	3,0	0,30	3,0
4	16,0	384,0	0,40	4,0	0,40	4,0
5	20,0	480,0	0,50	5,0	0,50	5,0
6	24,0	576,0	0,60	6,0	0,60	6,0
7	28,0	672,0	0,70	7,0	0,70	7,0
8	32,0	768,0	0,80	8,0	0,80	8,0
9	36,0	864,0	0,90	9,0	0,90	9,0
10	40,0	960,0	1,00	10,0	1,00	10,0
11	44,0	1056,0	1,10	11,0	1,10	11,0
12	50,0	1200,0	1,20	12,0	1,20	12,0

#### Проведение ИФА

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-.

2. В остальные лунки внести по 80 мкл блок-раствора и по 20 мкл исследуемых образцов. Содержимое лунок тщательно перемешивают осторожным постукиванием по краю планшета. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате 30 мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

3. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала (аккуратно, с помощью вошера или многоканальной пипетки), 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.



4. 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. 3.

5. 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.

6. Реакцию остановить добавлением в лунки по 50 мкл стоп-реагента и провести учет результатов.

7. 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		СС	
	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	1,20	12,0	1,20	12,0

7.1 Задать программу проведения ИФА и включить анализатор.

7.2 Приготовленный рабочий промывочный раствор залить в предназначенную для него емкость (входящую в комплект к ИФА-анализатору), остальные рабочие растворы и реагенты поместить в специальные контейнеры или емкости. Флаконы с контрольными образцами К+ и К-, и флаконы или пробирки с образцами исследуемых сывороток 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.

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 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\*.

Положительными считают образцы со значениями ОП превышающими или равными критическому значению ОП (ОП крит.).

ОП крит. рассчитывают по формуле:

ОП крит. = ср. знач. ОП К- + А,

где: А - коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки 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\*\*.

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

\*\* - «Для серии № \_\_\_\_\_ величина коэффициента А \_\_\_\_\_».

## X. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ



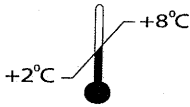



Срок годности - 24 месяца. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

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](mailto:info@npods.nnov.ru), [www.npods.ru](http://www.npods.ru).

## XI. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ на внутренней упаковке

	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Код партии (номер серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Используйте инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

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

Врио Зав. лабораторией трансфузионных  
гепатитов и контаминантов  
ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича  
Роспотребнадзора, к.б.н.



В. К. Пименов

Е. Л. Постнова