

УТВЕРЖДАЮ

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


И. Е. Колосов

21 сентября 2009 г.

№ 01-11/141-09

**ИНСТРУКЦИЯ
но применению набора реагентов
Тест-система иммуноферментная для
определения индекса авидности антител к вирусу гепатита С,
набор диагностический
«ДС-ИФА-АНТИ-HCV-АВИДНОСТЬ»**

Состав набора:

Иммуносорбент - смесь рекомбинантных антигенов, аналогичных структурным (HCV-core-Ag) и неструктурным (HCV-NS3-Ag, HCV-NS4-Ag и HCV-NS5-Ag) белкам вируса гепатита С, сорбированная в лунках планшета полистиролового 96-луночного разборного;

Конъюгат (концентрат х 11), жидкий - моноклональные антитела мыши к иммуноглобулинам G человека, конъюгированные с пероксидазой хрена;

K₁+ (контрольный высокоавидный положительный образец), жидкий - сыворотка крови человека, содержащая антитела к вирусу гепатита С (анти-HCV), не содержащая HBsAg и антитела к ВИЧ-1,2, инактивированная;

K₂+ (контрольный низкоавидный положительный образец), жидкий - сыворотка крови человека, содержащая антитела к вирусу гепатита С (анти-HCV), не содержащая HBsAg и антитела к ВИЧ-1,2, инактивированная;

K- (контрольный отрицательный образец), жидкий - сыворотка крови

Взамен инструкции № 01-11/109 - 06 от 30.06.2006 г.

человека, не содержащая HBsAg, антитела к HCV, антитела к ВИЧ-1,2 инактивированная;

БР (блок-раствор), жидкий - для разведения исследуемых сывороток;

РРК (раствор для разведения конъюгата), жидкий;

РД (раствор денатурирующий), жидкий - для определения avidности антител;

РС (раствор сравнения), жидкий - для определения avidности антител;

ПР (концентрат х 25), жидкий - 25-кратный концентрат фосфатно-солевого раствора с твином-20 - для промывания иммуносорбента;

СБ (Субстратный буферный раствор), жидкий;

ТМБ (хромоген) - тетраметилбензидин, жидкий;

Стоп-реагент - серная кислота, раствор 0,75 моль/л.

Набор рассчитан на проведение 48 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по два стрипа) использования набора или для одновременной постановки 48 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

Описание реагентов набора:

Иммуносорбент - разборный 96-луночный полистироловый планшет с прозрачными бесцветными лунками с сорбированными рекомбинантными антигенами;

Конъюгат (концентрат х 11) - прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная или светло-жёлтого цвета;

K₁+ (контрольный высокоавидный положительный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета;

K₂+ (контрольный низкоавидный положительный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость оранжевого цвета;

K- (контрольный отрицательный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость зеленого цвета;

РРК - прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость жёлтого цвета, допустимо образование аморфного осадка;

БР - непрозрачная жидкость голубого цвета, допустимо образование аморфного осадка;

РД - прозрачная жидкость сиреневого цвета, при температуре от 2 до 8 °С, допустимо образование кристаллического осадка;

РС - прозрачная жидкость зелено-голубого цвета;

ПР (концентрат х 25) - прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная или светло-жёлтого цвета, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании;

СБ - прозрачная бесцветная жидкость;

ТМБ - прозрачная бесцветная жидкость;

Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость.

Назначение

Набор предназначен для определения индекса avidности антител класса IgG к вирусу гепатита С в сыворотке (плазме) крови человека иммуноферментным методом с целью специфической диагностики первичной инфекции.

Меры безопасности

Для изготовления контрольных образцов набора использовать термоинактивированные сыворотки. При работе с набором в лаборатории с исследуемыми образцами обращаться, как с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, не пипетировать ртом. Твёрдые отходы (использованные планшеты, наконечники к пипеткам, флаконы из-под компонентов, лабораторную посуду и т. д.) обеззараживать погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства (СМС) или в 3 % раствор хлорамина Б или другого разрешенного к применению дез. средства. Длительность дезактивации - не менее 1 ч. Твёрдые отходы можно обезвреживать автоклавированием в течение часа при

температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывные воды) обезвреживать добавлением сухого хлорамина Б из расчёта 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) и при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.

Способ применения

Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока их годности.

Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при температуре от 18 до 24 °С. Внимание! Иммуносорбент необходимо выдержать в закрытом пакете во избежание конденсации влаги в лунках планшета.

Все растворы необходимо отбирать новыми одноразовыми наконечниками, не допускать касания жидкости в наконечнике краем дозатора!

Для отбора проб использовать калиброванные пипетки переменного объема (одно- и многоканальные) с погрешностью измерения не более 5 %.

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.

1. Перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых для постановки ИФА.

1. Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длинах волн 450 нм и 620-680 нм.

2. Пипетки переменного объема (одно- и многоканальные).

3. Наконечники одноразовые для пипеток переменного объема.

4. Термостат.
5. Устройство для промывания планшетов (вошер).
6. Автоматический анализатор для иммуноферментного анализа открытого типа.
7. Вода дистиллированная.
8. Бумага фильтровальная лабораторная.
9. Перчатки медицинские.

2. Приготовление рабочих растворов.

Объёмы реагентов для проведения анализа на необходимом количестве стрипов или на целом планшете приведены в таблицах № 1 и 2.

Таблица 1

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

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ГР (конц. x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. x 11) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
12	50,0	1200,0	1,20	12,0	1,20	12,0

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	
	ГР (конц. x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. x 11) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
2	8,0	192,0	0,20	2,0	0,20	2,0
4	16,0	384,0	0,40	4,0	0,40	4,0
6	24,0	576,0	0,60	6,0	0,60	6,0
8	32,0	768,0	0,80	8,0	0,80	8,0

10	40,0	960,0	1,00	10,0	1,00	10,0
12	50,0	1200,0	1,20	12,0	1,20	12,0

ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимое количество концентрата промывочного раствора отобрать в отдельную ёмкость и добавить соответствующее количество воды дистиллированной (согласно табл. №1 и 2). Полученный раствор тщательно перемешать.

Хранение: рабочий промывочный раствор хранить не более 3-х сут при температуре от 2 до 8 °С.

К₁+ - контрольный высокоавидный положительный образец, готов к применению.

К₂+ - контрольный низкоавидный положительный образец, готов к применению.

К- - контрольный отрицательный образец, готов к применению.

БР - для разведения исследуемых образцов, готов к применению. Перед использованием БР тщательно перемешать.

РРК - раствор для разведения конъюгата, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

Конъюгат, рабочий раствор, готовить перед использованием. Необходимое количество РРК перенести в чистую емкость, добавить соответствующее количество тщательно перемешанного концентрата конъюгата (согласно табл. № 1 и 2) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!).

Хранение: рабочий раствор конъюгата стабилен не более 12 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

ТМБ - хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин для приготовления субстратной смеси, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

СБ - субстратный буферный раствор для приготовления субстратной смеси, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

РД - раствор денатурирующий, готов к применению. Перед употреблением содержимое флакона тщательно перемешать.

РС - раствор сравнения, готов к применению. Перед употреблением содержимое флакона тщательно перемешать.

СС - субстратная смесь, готовить перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (согласно таблицам № 1 и 2), тщательно перемешать до полного растворения.

Хранение: допустимо хранение СС не более 10 ч в защищённом 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!

Стоп - реагент - готов к применению.

Хранение компонентов: после вскрытия флаконов оставшиеся неиспользованными компоненты тест-системы (ПР (концентрат х 25), К₁+, К₂+, К-, БР, РРК, конъюгат (концентрат х 11), РД, РС, СБ, ТМБ) хранить во флаконах, плотно закупоренных пробками (закрытыми винтовыми крышками), на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 °С до 8 °С.

3. Подготовка исследуемых образцов.

Определение индекса авидности возможно лишь для сывороток, показавших положительный результат при исследовании в тест-системе «ИФА-АНТИ-НСV» производства ООО «НПО «Диагностические системы» и подтвержденных в тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР-GM» того же производителя.

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-х суток 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). Образцы с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией могут дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо «осветлять» центрифугированием.

4. Проведение ИФА при ручной постановке.

4.1. Вскрыть фольгированный пакет с иммуносорбентом, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов. Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

Перед использованием иммуносорбент не промывать.

4.2. В лунки двух параллельных (нечетного и четного) стрипов иммуносорбента пипеткой переменного объема внести по 100 мкл K_1+ , K_2+ , $K-$.

Например: в 2 лунки A1 и A2 - K_1+ ,

в 2 лунки B1 и B2 - K_2+ ,

в 4 лунки C1 и C2, D1 и D2 - $K-$.

В остальные лунки внести по 30 мкл БР и по 70 мкл исследуемых образцов. Каждый образец внести попарно в соседние лунки двух параллельных стрипов (нечетного и четного). Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краю планшета. Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате в течение 1 ч при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

4.3. Содержимое лунок удалить в ёмкость для инфицированного материала. Планшет промыть 4 раза рабочим раствором ПР, залить его до краёв лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдерживая 40 сек, и удалить промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала.

4.4. В лунки нечетных стрипов внести по 100 мкл раствора сравнения, в лунки четных стрипов - по 100 мкл раствора денатурирующего. Планшет выдержать 8 мин при температуре от 18 до 24 °С.

4.5. Содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала, затем планшет промыть 4 раза рабочим раствором ПР (см. п. 3.2).

4.6. Во все лунки стрипов внести по 100 мкл конъюгата в рабочем разведении и покрытый крышкой или защитной пленкой планшет выдержать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

4.7. Содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала, после чего и планшет промыть 4 раза рабочим раствором ПР (см. п.4.3).

4.8. Во все лунки стрипов внести по 100 мкл СС и выдержать планшет в течение 30 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

4.9. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 50 мкл стоп реагента и провести учет результатов.

5. Учет результатов.

Учет результатов проводить спектрофотометрически при 2-х длинах волн - 450 нм и 620-680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учёт результатов при одной длине волны - 450 нм. Реакцию учитывать, если значение оптической плотности (ОП) в лунках с раствором сравнения (нечетные стрипы): для K_1+ - не менее 1,5, для K_2+ - не менее 0,5, а среднее значение ОП во всех лунках с К- - не более 0,5*.

Индекс авидности рассчитывать по формуле:

Индекс авидности = ОП исследуемого образца (реакция с раствором, денатурирующим белок) / ОП исследуемого образца (реакция с раствором сравнения) x 100 %.

Полученные результаты считать достоверными, если индекс авидности для K₁+ не менее 70 %, а индекс авидности для K₂+ не более 37 %.

Внимание! Расчет индекса авидности возможен лишь для сывороток, предварительно исследованных с помощью тест-системы «ИФА-АНТИ-HCV», определяющей антитела класса IgG к вирусу гепатита С и показавших положительный результат на наличие анти-HCV. В соответствии с принятым алгоритмом подтверждения наличия антител к HCV исследуемые образцы должны иметь положительный профиль реактивности в подтверждающем (конфирматорном) тесте «ДС-ИФА-АНТИ-HCV-СПЕКТР-GM».

Внимание! Набор «ДС-ИФА-АНТИ-HCV-АВИДНОСТЬ» не предназначен для скрининговых исследований и оптические плотности образцов не будут соответствовать результатам скрининга на анти - HCV.

6. Интерпретация результатов.

Если индекс авидности исследуемой положительной сыворотки менее 37 %, то сыворотка содержит низкоавидные IgG HCV антитела, что указывает на первичную инфекцию. Если индекс авидности исследуемой положительной сыворотки от 37 % и более, то сыворотка содержит высокоавидные IgG HCV антитела.

Примечание. Существуют данные о возможности уточнения стадии заболевания по индексу авидности (A. Xanno and Y. Kazuama. J. of Medical Virology. 2002. № 68.P.229-223):

1. Значение индекса авидности исследуемой положительной сыворотки от 32 % до 57 % (с использованием настоящего теста от 37 % до 72 %) указывает на паст-инфекцию.
2. Индекс авидности исследуемой положительной сыворотки, превышающий 64 % (с использованием настоящего теста более 66 %), указывает на обострение хронического процесса.

Для уточнения стадии заболевания и прогнозирования течения болезни необходимо медицинское обследование и комплексная динамическая оценка серологических маркеров HCV. Применение только настоящего теста

недостаточно, т. к. возможны ложнопозитивные результаты у больных гипергаммоглобулинемией, системными заболеваниями соединительной ткани, хроническими заболеваниями печени, у онкологических больных, при нарушениях аутоиммунного ответа и другими патологиями.

7. Проведение ИФА в автоматическом режиме на автоматическом анализаторе типа «TECAN Freedom EOlyzer» производства фирмы «TECAN», Швейцария (возможна постановка на других моделях ИФА-анализаторов открытого типа).

1. Задают программу проведения ИФА и включают анализатор.
2. Приготовленный рабочий промывочный раствор заливают в предназначенную для него емкость, остальные рабочие растворы и реагенты помещают 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 устанавливают в соответствующие штативы анализатора; помещают в анализатор необходимое количество иммуносорбентов.
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 учитывать, если значение оптической плотности (ОП) в лунках с раствором сравнения (нечетные стрипы): для К₁⁺ - не менее 1,5, для К₂⁺ - не менее 0,5, а среднее значение ОП во всех лунках с К⁻ - не более 0,5. Далее учет результатов проводить аналогично п 5.

Форма выпуска

Иммуносорбент	1 шт.
Конъюгат (концентрат х 11)	1,5 мл - 1 фл.
К ₁ ⁺ - контрольный высокоавидный положительный образец	1,5 мл - 1 фл.
К ₂ ⁺ - контрольный низкоавидный положительный образец	1,5 мл - 1 фл.
К ⁻ - контрольный отрицательный образец	2,5 мл - 1 фл.

БР	6,0 мл - 1 фл.
РРК	13,0 мл - 1 фл.
РД	8,0 мл - 1 фл.
РС	8,0 мл - 1 фл.
ПР (концентрат х 25)	50,0 мл - 1 фл.
СБ	15,0 мл - 1 фл.
ТМБ	1,5 мл - 1 фл.
Стоп-реагент	25,0 мл - 1 фл.

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

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетами или защитная пленка для ИФА планшетов – 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.

Срок годности. Условия транспортирования и хранения.

Срок годности набора - 12 мес.

По истечении срока годности набор использованию не подлежит.

Транспортирование наборов должно производиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С (допустимо транспортирование от 9 до 20 °С и не более 10 суток). Замораживание не допускается.

Набор должен храниться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности.

Условие отпуска - для диагностики «in vitro». Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на специфические и физические свойства набора 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. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12, 8-800-555-0300.

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

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



В. К. Пименов