



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Медицинского изделия для диагностики *in vitro*
Набора реагентов для выявления и подтверждения наличия
иммуноглобулинов классов G и М к индивидуальным белкам вируса
гепатита С методом иммуноферментного анализа
«ГепатитИФА-анти-HCV-спектр»
по ТУ 21.20.23-526-98539446-2020

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» предназначен для выявления и подтверждения наличия иммуноглобулинов классов G и М к индивидуальным белкам вируса гепатита С (core, NS3, NS4, NS5) в сыворотке, плазме крови (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль гепарина, K₂ЭДТА, K₃ЭДТА) и препаратах (иммуноглобулин, альбумин, лейкоцитарный интерферон, криопреципитат), приготовленных из крови человека (далее по тексту – препараты крови), методом твердофазного иммуноферментного анализа. Набор предназначен для ручной постановки и на автоматическом анализаторе открытого типа.

1.2. Гепатит С – вирусное заболевание, возбудитель которого представляет собой РНК-содержащий вирус сферической формы размером 30-60 нм, относящийся к семейству Flaviviridae. В геноме вируса гепатита С закодированы структурные (core, E1 и E2) и неструктурные белки (NS2, NS3, NS4 и NS5). Для вируса гепатита С

(ВГС) характерна значительная вариабельность генома. В настоящее время выделяются 6 генотипов и более 90 субтипов ВГС. Вариабельность генома вируса обуславливает изменения в строении антигенных детерминант, которые определяют выработку специфических антител, что препятствует элиминации вируса из организма и созданию эффективной вакцины против гепатита С.

Источник инфекции – люди, зараженные ВГС, в том числе находящиеся в инкубационном периоде. В основном вирус передается парентеральным путем. Однако возможны вертикальный путь передачи и заражение при половых контактах.

Инкубационный период (период от момента заражения до выработки антител или появления клинических симптомов) колеблется от 14 до 180 дней, чаще составляя 6—8 недель. ВГС характеризуется малосимптомным течением и высокой степенью хронизации процесса. Антитела к ВГС не защищают от повторного заражения, а лишь свидетельствуют о текущей или перенесенной инфекции. После перенесенного гепатита С антитела могут выявляться в сыворотке крови в течение всей жизни. Лабораторная диагностика заболевания основана на определении антител к ВГС методом ИФА и РНК ВГС методом ПЦР.

1.3. Функциональное назначение набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» – диагностика Гепатит С. Применяется для определения и подтверждения наличия спектра антител (IgG и IgM) к индивидуальным белкам вируса гепатита С (core, NS3, NS4, NS5) в образцах сыворотки и плазмы крови, препаратов крови, в том числе, при получении положительного результата в скрининговом исследовании и при обследовании доноров.

1.4. Набор «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» предназначен для однократного применения.

1.5. Набор «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» предназначен для клинической лабораторной диагностики *in vitro* сотрудниками клинико-диагностических лабораторий, медицинских учреждений и лабораторий службы крови.

1.6. Набор «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» предназначен для обследования всех групп населения без градации по демографическому или популяционному признаку.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ГепатитИФА-анти-НСV-спектр» использован вариант двухстадийного твердофазного иммуноферментного анализа. Для определения спектра антител к ВГС рекомбинантные белки (core, NS3, NS4, NS5) иммобилизованы на внутренней поверхности лунок по отдельности. Лунки с одноименными белками расположены рядами. Белок core внесен в ряды А, Е, NS3 – в ряды В, F, NS4- в ряды С, G, NS5- в ряды D, H. Если в образце присутствуют антитела к ВГС, то во время первой инкубации они связываются с рекомбинантными антигенами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время второй инкубации антитела к иммуноглобулинам G и M человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с образовавшимся на первой стадии комплексом антиген – антитело. (Рисунок 1).

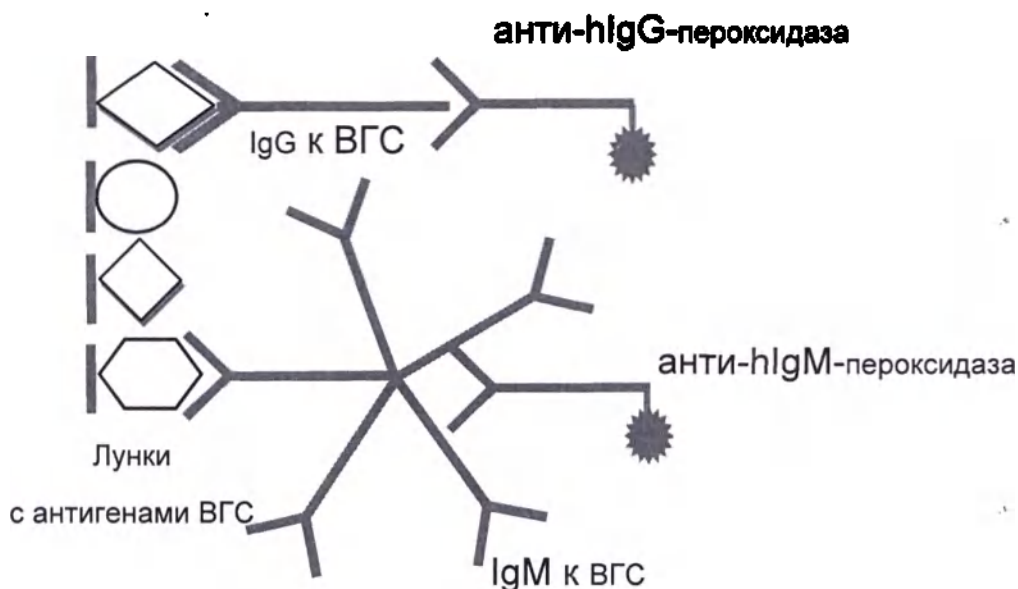


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству антител к ВГС в анализируемых пробах. После измерения оптической

плотности раствора в лунках наличие специфических антител к ВГС оценивают относительно значения коэффициента позитивности.

2.2. Состав и комплектации набора

Набор «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» выпускается в трех комплектациях:

Комплектация №1: на 24 определения при проведении анализа вручную или на автоматическом анализаторе «Alisei Q.S.»¹, SEAC/Next Level, Италия (далее «Alisei») при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Комплектация №2: на 48 определений при проведении анализа вручную или на автоматическом анализаторе «Alisei» при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Комплектация №3: на 120 определений при проведении анализа вручную или на автоматическом анализаторе «Alisei» при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Обратите внимание, при каждой постановке анализа на каждой планшете обязательно нужно определять оптические плотности (ОП) отрицательной контрольной пробы (ОКП) и положительной контрольной пробы (ПКП) в соответствии со схемой маркировки лунок (п.7.2.1.1.).

***Примечание:** в случае дробного применения набор может быть использован только в течение шести месяцев после вскрытия компонентов набора.*

Состав набора:

- комплект из двенадцати 8-луночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок рекомбинантными антигенами ВГС (core, NS3, NS4 и NS5), маркирован «Стрипы с рекомбинантными антигенами вируса гепатита С, спектр» – 1, 2 или 5 упаковок в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- отрицательная контрольная проба (ОКП), не содержащая антител к ВГС. Флакон маркирован «Отрицательная контрольная проба» – 1 флакон (0,8 мл) или 1 или 2 флакона (по 2,0 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

¹ Допускается постановка анализа на других автоматических анализаторах для ИФА открытого типа, за информацией о необходимой комплектации набора и программе проведения анализа обращайтесь к производителю набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» в ООО «Компания Алкор Био», тел/факс: 8(812)6778779.

- положительная контрольная проба (ПКП), содержащая антитела к ВГС. Флакон маркирован «Положительная контрольная проба» – 1 или 2 флакона (по 2,0 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» - 1 или 2 флакона (по 10 мл), или 1 флакон (50 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- конъюгат анти-hIgG-hIgM-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1, 2 или 5 флаконов (по 14 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Н (20Х)» – 1 или 2 флакона (по 50 мл) или 3 флакона (по 100 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- раствор тетраметилбензидина, содержащий тетраметилбензидин, перекись водорода и стабилизаторы, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 или 2 флакона (по 14 мл) или 1 флакон (100 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- стоп-реагент, 3,59% раствор соляной кислоты, маркирован «Стоп-реагент» – 1 или 2 флакона (по 50 мл) или 3 флакона (по 100 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- одноразовая ванночка – 2 шт или 4 шт в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- одноразовый наконечник – 16 шт или 32 шт в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- пакет закрывающийся полиэтиленовый (при упаковке стрипов в пакет из материала пленочного) – 1, 2 или 5 шт. в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1).

Таблица 1

Кат. номер		200-77	200-78	200-79
Название компонента	Цветовая кодировка компонента	Комплектация №1	Комплектация №2	Комплектация №3
Стрипы с рекомбинантными антигенами вируса гепатита С, спектр	-	1 шт.	2 шт.	5 шт.
Отрицательная контрольная проба (ОКП)	Жидкость желтого цвета	1 фл. (0,8 мл)	1 фл. (2,0 мл)	2 фл. (по 2,0 мл)
Положительная контрольная проба (ПКП)	Жидкость красного цвета	1 фл. (2,0 мл)	1 фл. (2,0 мл)	2 фл. (по 2,0 мл)
Аналитический водно-солевой раствор (Буфер А)	Жидкость бурого цвета	1 фл. (10 мл)	2 фл. (по 10 мл)	1 фл. (50 мл)
Конъюгат Е	Жидкость розового цвета	1 фл. (14 мл)	2 фл. (по 14 мл)	5 фл. (по 14 мл)
Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (Буфер Н (20X))	Бесцветная жидкость	1 фл. (50 мл)	2 фл. (по 50 мл)	3 фл. (по 100 мл)
Раствор ТМБ	Бесцветная или бледно-желтого цвета, или светло-бурого цвета жидкость	1 фл. (14 мл)	2 фл. (по 14 мл)	1 фл. (100 мл)

Стоп-реагент	Бесцветная жидкость	1 фл. (50 мл)	2 фл. (по 50 мл)	3 фл. (по 100 мл)
Одноразовая ванночка	-	2 шт.	2 шт.	4 шт.
Одноразовый наконечник	-	16 шт.	16 шт.	32 шт.
Пакет закрывающийся полиэтиленовый	-	1 шт.	2 шт.	5 шт.

В комплект поставки входят: набор реагентов, принадлежности, инструкция по применению, паспорт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ²

3.1. Аналитическая чувствительность.

В связи с отсутствием эталонных материалов ВОЗ для измерения титра антител к ВГС, аналитическая чувствительность определяется относительно внутреннего контрольного образца (ВКО), который аттестован в зарегистрированной в РФ референсной тест-системе. Набор «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» определяет ВКО как положительный образец.

Чувствительность набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» сероконверсии оценивалась путем тестирования 10 сероконверсионных панелей: HCV Seroconversion Panel (Genotype 1a, № HCV10071, ZeptoMetrix Corporation), HCV Seroconversion Panel (Genotype 3a, HCV9054, ZeptoMetrix Corporation), Hepatitis C Seroconversion Panel (genotype 2b, PHV915, SeraCare), Hepatitis C Seroconversion Panel (genotype 2b, PHV917(M), SeraCare) Hepatitis C Seroconversion Panel (genotype 1a, PHV918(M), SeraCare), Hepatitis C Seroconversion Panel (genotype 1a, PHV919, SeraCare), HCV Seroconversion Panel Modified (genotype 1a, PHV920(M), SeraCare), HCV Seroconversion Panel (genotype 3a, PHV921, SeraCare), HCV Seroconversion Panel (genotype 3a, PHV922, SeraCare), HCV Seroconversion Panel (genotype 2b, PHV924, SeraCare). Наличие антител в образцах было подтверждено с помощью набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр». Полученные результаты

² Информация будет дополнена после проведения клинических испытаний

эквивалентны показателям референсной тест-системы и паспорту производителя панелей.

3.2. Аналитическая чувствительность

В связи с отсутствием эталонных материалов ВОЗ для измерения титра антител к ВГС, аналитическая чувствительность определяется относительно внутреннего контрольного образца (ВКО), который аттестован в зарегистрированной в РФ референсной тест-системе. Набор «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» определяет ВКО как положительный образец.

Чувствительность набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» сероконверсии оценивалась путем тестирования 8 сероконверсионных панелей: HCV Seroconversion Panel (Genotype 1a, № HCV10071, ZeptoMetrix Corporation), HCV Seroconversion Panel (Genotype 3a, HCV9054, ZeptoMetrix Corporation), Hepatitis C Seroconversion Panel (genotype 2b, PHV915, SeraCare), Hepatitis C Seroconversion Panel (genotype 2b, PHV917(M), SeraCare), Hepatitis C Seroconversion Panel (genotype 1a, PHV919, SeraCare), HCV Seroconversion Panel Modified (genotype 1a, PHV920(M), SeraCare), HCV Seroconversion Panel (genotype 3a, PHV921, SeraCare), HCV Seroconversion Panel (genotype 3a, PHV922, SeraCare). Наличие антител в образцах было подтверждено с помощью набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр». Полученные результаты эквивалентны показателям референсной тест-системы и паспорту производителя панелей.

3.3. Диагностическую чувствительность набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» определяли при исследовании 440 образцов сыворотки и плазмы крови человека, содержащих антитела к ВГС, как долю полученных положительных результатов к общему количеству положительных образцов. Все 440 образца были определены как положительные. Диагностическая чувствительность составила 100% (с учетом 95% ДИ: 99,3%-100%).

- 440 образцов сыворотки и плазмы с антикоагулянтами в т.ч. образцы последовательной сдачи крови; образцы с низкой, высокой и умеренной вирусной нагрузкой; образцы, содержащие разные генотипы (1a, 1b, 2a, 2b, 3a), образцы, полученные от пациентов с подтвержденной микст-

инфекцией (+ гепатит В; +ВИЧ-инфекция; + гепатит А), свежие образцы (взяты в день исследования) сыворотки и плазмы крови.

- 14 образцов препаратов крови (альбумин, лейкоцитарный интерферон, иммуноглобулин, криопреципитат), контаминированных положительной сывороткой крови.

Статистическая достоверность диагностической чувствительности для каждого вида биологического материала составила:

Клинический материал	Количество исследованных образцов	Результаты испытаний
		Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%)
Сыворотка крови человека	290	99,0 – 100 %
Плазма крови человека (ЭДТА (К2ЭДТА, К3ЭДТА), цитрат натрия 3,2%, гепарин)	150	98,0 – 100 %
Препараты крови (альбумин, интерферон, иммуноглобулин, криопреципитат), контаминированные положительной сывороткой крови.	14	80,7 – 100 %

Установлено, что набор «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» определяет все положительные образцы генотипических панелей BBI (SeraCare) PHV 250 (генотипы 1-3) и HCV Worldwide Performance Panel 0810-0230 (SeraCare) генотипы (1-6) как положительные.

Дополнительно исследованы образцы функциональной панели HCV Low Titer 0810-0192 (SeraCare). 10 положительных по паспорту образцов набор «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» определил как положительные или неопределенные, т.е. реактивные в отношении одного из неструктурных антигенов.

Чувствительность набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» по стандартной панели предприятия (СПП анти-HCV) и составляет 100%.

Чувствительность набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» с образцами препаратов крови человека определяется по Панели

предприятия препаратов крови анти-HCV-спектр (ПППК анти-HCV-спектр) составляет 100%.

3.4. Аналитическая специфичность набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» определяется как способность теста обнаруживать только антитела к ВГС в присутствии интерферирующих факторов в исследуемом материале.

Наличие антикоагулянтов (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль гепарина, K_2 ЭДТА, K_3 ЭДТА) в пробах не оказывает негативного воздействия на результаты анализа, что было подтверждено не менее чем на 25 положительных и 25 отрицательных образцах каждого вида биоматериала в анализе с помощью набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр».

Повышение концентрации гемоглобина до 2 г/л, неконъюгированного и конъюгированного билирубина до 40 мг/дл, сывороточного альбумина до 60 г/л или триглицеридов до 35 г/л в пробах не оказывает негативного воздействия на результаты анализа с помощью набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр». Повышение концентрации гемоглобина более 2 г/л может оказать негативное действие на результат анализа. Не следует использовать гемолизированные или мутные образцы.

Наличие перекрёстных реакций в образцах, полученных от беременных женщин, от пациентов с вирусными инфекциями (гепатитом А, В, Е, цитомегаловирусной инфекцией, ВИЧ-инфекцией, вирусом простого герпеса, вирусом Варицелла-Зостер, вирусом Эпштейна-Барр, вирусом краснухи, с парвовирусом, вирусом клещевого энцефалита, с эпидемическим паротитом), от пациентов с сифилисом, токсоплазмозом, инфекциями, вызванными *E. coli*, от пациентов с невирусными заболеваниями печени и от пациентов, в чьих пробах обнаружен ревматоидный фактор, не обнаружено.

3.5. Диагностическую специфичность набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» определяли при исследовании 860 образцов сыворотки или плазмы (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль гепарина, K_2 ЭДТА, K_3 ЭДТА) крови человека, не содержащих антител к ВГС.

Из них:

- 200 образцов сыворотки крови, полученных от доноров,

- 100 потенциально перекрестно-реагирующих образцов,
- 560 образцов, не содержащих антител к ВГС, полученных от пациентов с неинфекционными заболеваниями и от пациентов, подлежащих плановому профилактическому обследованию,
- 10 образцов с ложноположительными результатами, полученными в ходе скрининговых исследований,
- 20 образцов препаратов крови (альбумин, иммуноглобулин, лейкоцитарный интерферон, криопреципитат).

Все образцы определены как отрицательные набором «ГепатитИФА-анти-НСV-спектр» и набором сравнения.

Диагностическая специфичность набора «ГепатитИФА-анти-НСV-спектр» на данной выборке образцов составила 99,7% (с учетом 95% ДИ 99,7%-100,0%).

Статистическая достоверность диагностической специфичности для каждого вида биологического материала составила:

Клинический материал	Количество исследованных образцов	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%)
Сыворотка крови человека	469	99,4 – 100 %
Плазма крови человека (К2ЭДТА, К3ЭДТА, цитрат натрия 3,2%, натриевая соль гепарина, литиевая соль гепарина)	401	99,3 – 100 %
Препараты крови (альбумин, иммуноглобулин, лейкоцитарный интерферон, криопреципитат)	20	86,1 – 100 %

Специфичность набора «ГепатитИФА-анти-НСV-спектр» по СПП анти-НСV составляет 100%.

Специфичность набора «ГепатитИФА-анти-НСV-спектр» по Панели предприятия препаратов крови анти-НСV-спектр (ПППК анти-НСV-спектр) составляет 100%.

3.6. Коэффициент вариации коэффициента позитивности³ в одном и том же образце с использованием набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» не превышает 8%. Внутрисерийная воспроизводимость не превышает 8%. Межсерийная воспроизводимость не превышает 8%.

3.7. Ограничение теста

Пробы пациентов, принимавших накануне сдачи крови алкоголь, соленую, жирную и острую пищу, подвергавшихся стрессам и физическому перенапряжению, для анализа с помощью набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» использовать недопустимо.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.6. Потенциальный риск применения набора — класс 3 (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ №4н от 06.06.2012 г.).

4.7. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.8. При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2333-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.9. Набор предназначен для профессионального применения персоналом, имеющим квалификацию для выполнения диагностических исследований *in vitro* после специального образования и обучения. Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием (врач КДЛ, биолог, медицинский технолог).

4.10. Перед началом работы ознакомиться с инструкцией и применять набор строго по назначению.

³ При измерении на одном и том же оборудовании, либо оборудовании со схожими техническими характеристиками.

4.11. В состав компонентов набора входят соляная кислота в концентрации 3,59% и консерванты в концентрации менее 0,05%, что является безопасным для человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

4.12. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, разрешенные к применению на территории РФ, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

4.13. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно. Поскольку ИФА чувствителен к ионам металлов, контакт металлических предметов с компонентами набора недопустим.

4.14. Для обработки посуды и оборудования рекомендуется использовать дезинфицирующие средства, изготовленные на основе третичных аминов, четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) или спиртов и разрешенные к применению на территории РФ. Использование дезинфицирующих средств на основе активного кислорода и хлора возможно лишь на предстерилизационном этапе, с последующей термической стерилизацией.

4.15. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.16. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.17. Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

4.18. Все использованные одноразовые материалы и остатки образцов должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с

последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.19. После использования стрипы, контрольные пробы, образцы и все расходные материалы, которые контактировали с образцами во время обработки, хранения или анализа (флаконы, перчатки, наконечники и т.д.) должны собираться отдельно и стерилизоваться в автоклаве с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21. Вместо автоклавирования наконечники могут быть стерилизованы дезинфицирующим средством, после утилизированы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

4.20. Во время процедуры ручной промывки планшета содержимое лунок необходимо выбрасывать в контейнер с дезинфицирующим раствором на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов.

4.21. Не использовать набор по истечении срока годности.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 450 нм и 600-655 нм⁴;

- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–700 об/мин при температуре +37°C⁴;

- автоматическое промывочное устройство (вошер) для иммунологических планшетов^{4,5};

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными одноразовыми наконечниками⁶ с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 20–200 мкл; на 100–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;

⁴ Допускается использование автоматических анализаторов для ИФА открытого типа с аналогичными характеристиками, за информацией о необходимой комплектации набора и программе проведения анализа обращайтесь к производителю набора «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» в ООО «Компания Алкор Био», тел/факс: (812) 677-8779.

⁵ При использовании автоматического промывочного устройства необходимо тщательно следить за его состоянием, периодически проверять емкости и соединительные шланги для промывочных буферов на наличие микробиологического зароста и других загрязнений, проводить техническое обслуживание в соответствии с рекомендациями производителя оборудования.

- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными одноразовыми наконечниками⁶, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 100-1000 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная или очищенная деионизованная⁷;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- дезинфицирующий раствор на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов;

- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

Дополнительно для проведения анализа на анализаторе «Alisei»:

- автоматический иммуноферментный анализатор «Alisei»⁴;
- многоцелевые полипропиленовые пробирки⁸ 12x75 вместимостью 5 мл;
- концентрированный водный раствор Триала, 5000-кратный концентрат, маркирован «Триал»⁸;
- концентрированный водный раствор «Солар», 5-кратный концентрат, маркирован «Солар»⁸.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.6. Эквивалентность образцов сыворотки и плазмы крови человека, содержащих антикоагулянты (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль гепарина, K₂ЭДТА, K₃ЭДТА), подтверждена не менее чем на 25 положительных и 25 отрицательных образцах каждого вида биоматериала в анализе с помощью набора «ГепатитИФА-анти-НСV-спектр».

6.7. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в

⁶Повторное использование наконечников не допускается. При внесении каждого образца необходимо использовать новый наконечник.

⁷В соответствии с ГОСТ 6709-72 «Вода дистиллированная. Технические условия» необходимо периодически контролировать качество воды, используемой для приготовления растворов.

⁸Компоненты, не входящие в состав набора, поставляются по отдельному заказу.

пробирку, содержащую антикоагулянт (цитрат натрия 3,2%, литиевую соль гепарина, натриевую соль гепарина, K_2 ЭДТА, K_3 ЭДТА). После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку.

6.8. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или мутную сыворотку и плазму, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия. Не допускается использовать образцы с признаками бактериального загрязнения.

6.9. Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 5-ти суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре -20°C и ниже. Допускается повторное замораживание образца не более 3-х раз.

6.10. Препараты крови хранить в соответствии с инструкцией по применению данного препарата. Лиофильно высушенные препараты крови перед использованием в тест-системе растворить в соответствии с инструкцией по применению данного препарата. Жидкие препараты крови исследовать аналогично другим образцам.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.6. Подготовка реагентов

7.6.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) (далее КТ) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.6.2. Контрольные пробы готовы к использованию.

7.6.3. Буфер А готов к использованию.

7.6.4. Конъюгат Е готов к использованию.

7.6.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Н (20X) развести дистиллированной или очищенной деионизованной водой в 20 раз.

Например: 50 мл буфера Н (20X) + 950 мл воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.6.6. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию.

7.6.7. Стоп-реагент готов к использованию.

7.6.8. Рабочий раствор Триала. Необходимое количество концентрированного раствора Триала развести дистиллированной или очищенной деионизованной водой в 5000 раз.

Например: 1 мл Триала + 4999 мл воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.6.9. Рабочий раствор «Солар». Необходимое количество концентрированного раствора «Солар» развести дистиллированной или очищенной деионизованной водой в 5 раз.

Например: 10 мл «Солар» + 40 мл воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.6.10. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до КТ.

7.7. Постановка анализа

7.7.1. Ручная постановка

На странице 30 приведена схема проведения анализа.

Каждый образец, включая ОКП и ПКП, вносят в 4 лунки по вертикали. В рядах А,Е – сорбирован антиген core, В, F – NS3, СG – NS4, D, H-NS5.

7.2.1.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

А1, В1, С1, D1 – для измерения величины ОП ОКП;

Е1, F1, G1, H1 – для измерения величины ОП ПКП;

А2, В2, С2, D2 – для измерения величины ОП образца1;

Е2, F2, G2, H2 – для измерения величины ОП образца2;

И т.д.

7.2.1.2. Внести во все лунки по 70 мкл Буфера А.

7.2.1.3. Внести в соответствующие протоколу маркировки лунки по 30 мкл контрольных проб, в оставшиеся лунки – по 30 мкл исследуемых образцов. Цвет раствора изменится с бурого на зеленый.

Примечание: В наборе «ГепатитИФА-анти-НСV-спектр» общее время внесения контрольных проб и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации различных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.1.4. Инкубировать стрипы в течение 30 минут с шейкированием в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500-700 об/мин;

7.2.1.5. По окончании первой инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов и промыть лунки 4 раза. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п.7.1.5., с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства. При автоматической промывке необходимо заполнять лунки полностью и следить за качеством аспирации.

7.2.1.6. По окончании промывки немедленно внести по 100 мкл конъюгата Е.

7.2.1.7. Инкубировать стрипы в течение 30 минут с шейкированием в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500-700 об/мин;

7.2.1.8. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов и промыть лунки 4 раза в соответствии с п 7.2.1.5.

7.2.1.9. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ и инкубировать стрипы. Возможны 2 варианта инкубации с ТМБ:

Вариант 1: Инкубирование стрипов в темноте в течение 10 минут с шейкированием в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500-700 об/мин.

Вариант 2: Инкубирование стрипов в темноте в течение 20 минут без шейкирования при КТ.

7.2.1.10. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхнуть рамку аккуратным постукиванием в течение 20-30 секунд или на шейкере в течение 5-10 секунд при комнатной температуре.

Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после внесения стоп-реагента, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при КТ.

7.2.2. Постановка на анализаторе «Alisei»

Анализатор «Alisei» имеет полностью автоматизированный процесс проведения анализа: внесение реагентов, инкубирование, промывка, измерение оптической плотности, обработка результатов. Программа «ГепатитИФА-анти-НСV-спектр» введена в память анализатора.

7.2.2.1. При каждой постановке анализа на каждом планшете обязательно нужно определять ОП ОКП и ПКП.

7.2.2.2. В случае **дробного** применения набора необходимо извлечь контрольные пробы из автоматического анализатора после их внесения в лунки всех планшетов, участвующих в постановке, и, плотно закрыв крышками, убрать в холодильник. Не допускается повторное использование контрольных проб, находившихся на борту анализатора в течение всей сессии, вне зависимости от ее длительности. Остальные жидкие реагенты убрать в холодильник сразу по окончании сессии. Эти ограничения обусловлены естественным испарением жидкостей, приводящим к получению некорректных результатов измерения при последующем использовании реагентов.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. После выполнения ручной постановки измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм, рекомендуется использование референсного фильтра 600-655 нм.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** ОП, полученную на референсном фильтре, из ОП, полученной при 450 нм, для каждой лунки.

Допускается использовать только результаты сканирования при 450 нм.

8.2. Критерии достоверности анализа

Результаты анализа считают достоверными при соблюдении следующих условий:

-значение ОП в лунках (core, NS3, NS4, NS5), содержащих ОКП, должно быть не более 0,2 ед.ОП;

-значение ОП в лунках (core, NS3, NS4, NS5), содержащих ПКП, должно быть не менее 1,0 ед.ОП;

В случае, если полученные данные выходят за пределы указанных значений, результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ (только для ручной постановки)

9.1. Определить значение ОПкрит. для каждого антигена отдельно, для чего к значению ОП ОКП в каждой лунке прибавить Ккрит.

$$\text{ОПкрит} = \text{ОПокп} + \text{Ккрит}, \text{ где}$$

Ккрит. – коэффициент, определяемый на предприятии-изготовителе и указанный в аналитическом паспорте. Для каждого антигена Ккрит определяется отдельно.

9.2. Определить коэффициенты позитивности (Кпоз.) для каждого образца по 4 антигенам. Для этого разделить значения ОП в каждой лунке исследуемого образца на соответствующее получившееся значение ОПкрит. для каждого антигена отдельно:

$$\text{Кпоз} = \text{ОПобр} / \text{ОПкрит}$$

9.3. Пример:

$\text{Ккрит} = 0,15$

$\text{ОП ОКП}_{\text{core}} = 0,015, \text{ ОПкрит}_{\text{core}} = 0,015 + 0,15 = 0,165$

$\text{ОП ОКП}_{\text{NS3}} = 0,020, \text{ ОПкрит}_{\text{NS3}} = 0,020 + 0,15 = 0,170$

$\text{ОП ОКП}_{\text{NS4}} = 0,025, \text{ ОПкрит}_{\text{NS4}} = 0,025 + 0,15 = 0,175$

$\text{ОП ОКП}_{\text{NS5}} = 0,010, \text{ ОПкрит}_{\text{NS5}} = 0,010 + 0,15 = 0,160$

Тогда расчет Кпоз. для образца 1 будет следующим:

$\text{ОП обр1}_{\text{core}} / 0,165 = \text{Кпоз.обр.1}_{\text{core}}$

$\text{ОП обр1}_{\text{NS3}} / 0,170 = \text{Кпоз.обр.1}_{\text{NS3}}$

$\text{ОП обр1}_{\text{NS4}} / 0,175 = \text{Кпоз.обр.1}_{\text{NS4}}$

$\text{ОП обр1}_{\text{NS5}} / 0,160 = \text{Кпоз.обр.1}_{\text{NS5}}$

10. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если Кпоз. образца $< 0,9$ для каждого антигена, то считают, что исследуемый образец не содержит антител к антигенам ВГС, результат **отрицательный**.

Если Кпоз. в лунках с антигеном core или в любых двух и более лунках ≥ 1 , результат расценивается как **положительный**.

Если Кпоз. для любого антигена находится в диапазоне $0,9 \leq \text{Кпоз} < 1,0$ или $\text{Кпоз} \geq 1$ только по одному неструктурному антигену (NS3, NS4, NS5), результат расценивается как **неопределенный**.

Следует учитывать, что при отсутствии инфекции существует вероятность получения ложноположительного результата, например, у людей, недавно вакцинированных, под воздействием принимаемых лекарственных средств, при аутоиммунных заболеваниях, при беременности или при доброкачественных/злокачественных трансформациях клеток и т.п.

При наличии инфекции существует вероятность получения ложноотрицательного результата, например, в период сероконверсии, при аутоиммунных заболеваниях или у пациентов на гемодиализе. Ни один из известных методов тестирования не дает полной гарантии отсутствия инфекции.

Если для образца получен неопределенный результат рекомендуется провести ПЦР анализ, а через 2-3 недели после первого забора крови провести анализ на наличие антител к ВГС повторно взятого образца.

Исключения случайной ошибки добиваются перестановкой в дубликатах. Для получения корректных данных при сравнительной оценке рекомендуется аликвотировать образцы крови и хранить в соответствии с п. 6.4. Перед проведением анализа аликвоту вынуть из морозильной камеры, дать нагреться до комнатной температуры, тщательно перемешать и отцентрифугировать.

В силу разнообразия используемого сырья, широкого спектра иммунологических реакций в образцах пациентов, тесты разных производителей могут давать различающиеся результаты для одних и тех же проб. Результаты, полученные в разное время, в разных лабораториях или при использовании тест-систем разных производителей, не могут сравниваться количественно, а только по диагнозу (т.е., как положительные или отрицательные).

Основанием для постановки диагноза не может служить результат единичной постановки ИФА. Диагноз устанавливается по совокупности клинических и лабораторных данных.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1. Набор «ГепатитИФА-анти-HCV-спектр» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

Срок годности набора — 15 месяцев.

11.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час, но не менее, чем за 30 минут до проведения анализа.

11.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить в пакет с этикеткой, затем в пакет закрывающийся полиэтиленовый и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- контрольные пробы, буфер А, конъюгат Е, раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 6 месяцев;
- стоп-реагент, концентрированные водно-солевой раствор для промывки лунок, раствор Триала, раствор Солар после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- водно-солевой раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым при КТ не более 5 суток или при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 4 недель;



- раствор Триала, подготовленный к использованию, хранить закрытым при КТ не более 5-ти суток.
- раствор Солара, подготовленный к использованию, хранить закрытым при температуре +2...8°C не более 4 недель.

11.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- для каждого независимого анализа необходимо определение ОП ОКП и ПКП;
- запрещается возвращать избыток буфера А, конъюгата Е, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения;
- запрещается повторное использование контрольных проб, находившихся на борту анализатора в течение всей сессии, вне зависимости от ее длительности.

11.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящих в состав данного набора реагентов. Запрещается смешивать растворы ТМБ с различными буквенными обозначениями в сериях.

11.6. Запрещается использовать промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

11.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

11.8. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

11.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

11.10. Таблица расхода реагентов (при постановке ИФА вручную)

Количество используемых стрипов	Буфер А, мл	Конъюгат Е, мл	Промывочный раствор		Раствор ТМБ, мл	Стоп-реагент, мл
			Буфер Н (20Х), мл	Дистиллированная или очищенная деионизованная вода, мл		
2	1,7	2,3	8	152	2,3	2,3
3	2,5	3,5	12	228	3,5	3,5
4	3,3	4,7	16	304	4,7	4,7
5	4,1	5,8	20	380	5,8	5,8
6	5,0	7,0	24	456	7,0	7,0
7	5,8	8,2	28	532	8,2	8,2
8	6,6	9,3	32	608	9,3	9,3
9	7,2	10,5	36	684	10,5	10,5
10	8,0	11,7	40	760	11,7	11,7
11	8,8	12,8	44	836	12,8	12,8
12	10,0	14,0	50	950	14,0	14,0

12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

12.1. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$.

Транспортирование изделий при температурах $+2...8^{\circ}\text{C}$ должно производиться в ёмкостях или при помощи холодильных установок, обеспечивающих регламентированный температурный режим.

Допускается транспортирование набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 15 суток, в том числе при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ не более 1 суток.

12.2. Набор, транспортированный с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

13. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

13.1. При утилизации наборы с истекшим сроком годности должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами в соответствии с требованиями МУ287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

13.2. При использовании набора образуются отходы классов А, В и Г, которые утилизируются в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

14. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам качества набора «ГепатитИФА-анти-НСV-спектр» обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный проспект, д. 40 лит. А, тел/факс: 8(812) 677-87-79.

Бесплатный телефон по России: 8-800-234-37-79.

15. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ЭТИКЕТКАХ

	Только для <i>in vitro</i> диагностики		Количество тестов
	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Номер серии		Срок годности
	Производитель		Хранить при
	Дата изготовления		Биологический риск
	Ознакомьтесь с инструкцией		Беречь от влаги

Инструкция разработана в соответствии с ТУ 21.20.23-526-98539446-2020.



Примечания к Схеме проведения анализа:

КП – контрольные пробы;

ОП – оптическая плотность;

КТ – комнатная температура (+18...25°C);

ПО – программное обеспечение.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА (только для ручной постановки)

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	70 мкл Буфер А	КТ (+18...+25°C)	Внесение КП и исследуемых образцов не более 15'	Каждый образец вносить в 4 лунки по вертикали
2		30 мкл х 4 каждой КП			
3		30 мкл х 4 исследуемых образцов			
4	Инкубация №1	—	+37°C	30'	Термостатируемый шейкер, 500-700 об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного			1*промывочный раствор = = 50 мл буфера Н (20Х) + 950 мл Н₂О
6	Внесение реагентов	100 мкл конъюгат Е			
7	Инкубация №2	—	+37°C	30'	Термостатируемый шейкер, 500-700 об/мин
8	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (4 раза)			1*промывочный раствор = = 50 мл буфера Н (20Х) + 950 мл Н₂О
9	Внесение реагентов	100 мкл ТМБ			Во все лунки
10	Инкубация с ТМБ	—	+37°C	10'	Термостатируемый шейкер, 500-700 об/мин
			или КТ	20'	В темноте, без шейкирования
11	Остановка ферментной	100 мкл стоп-реагента			
12	Перемешивание		КТ	20-30"	Постукивание рамки
				5 – 10"	Шейкер
13	Регистрация результатов			В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 и 600-655 нм
14	Обработка результатов				Калькулятор, соответствующее ПО

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 27 (двадцать семь); лист 13



Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Д.Г. Полинцев