

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"

Т.Ю.Гашенко
2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия
антител к вирусу гепатита С»
«ИФА-ВГС»

Комплект № 3, №3R

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС» предназначен для качественного выявления и подтверждения наличия антител классов IgG и IgM к антигенам вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке (плазме) крови человека, а также препаратах, приготовленных из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин) методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Функциональное назначение: скрининг, подтверждение и диагностика. Применение изделия не имеет популяционных и демографических ограничений.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики in vitro.

Показания и противопоказания к применению изделия

Основные показания к применению: профилактическое обследование доноров, лиц из групп риска, при подготовке к госпитализации, оперативному вмешательству, беременности, диагностика острой фазы гепатита С, диагностика хронического гепатита С.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Вирус гепатита С (ВГС, HCV) — антропоноз; единственный источник (резервуар) возбудителя инфекции — человек, больной острым или хроническим гепатитом. ВГС относится к кровоконтактным инфекциям. Механизмы заражения: естественный (вертикальный — при передаче вируса от матери к ребенку, контактный — при использовании предметов быта и при половых контактах) и искусственный (артифициальный). Искусственный путь заражения может быть реализован посредством гемотрансфузий инфицированной крови или ее препаратов и любых парентеральных манипуляций (медицинского и немедицинского характера), сопровождающихся нарушением целостности кожного покрова и слизистых оболочек.

Вирус гепатита С относится к семейству Flaviviridae, роду Hepacivirus. Геном ВГС представлен однонитевой позитивной цепью РНК, длиной около 9600 нуклеотидных оснований (н.о.). Терминальные части генома ВГС представлены 5' и 3' нетранслируемыми регионами. Вирусная РНК содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин-предшественник размером 3010-3033 аминокислотных остатков, из которого в результате процессинга образуются структурные (core, E1, E2, p7) и неструктурные (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) белки. Структурные белки формируют вирусную частицу. Неструктурные белки участвуют в репликации генома ВГС и процессинге полипротеина-предшественника. Современная классификация включает 7 генотипов (1–7), подразделенных на 88 субтипов (a, b, c

т.д.), а также 9 межгенотипных рекомбинантных форм. Наибольшее распространение получили всего 6 субтипов ВГС (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a), которые признаны эпидемическими вариантами, обусловившими глобальное распространение инфекции на протяжении XX в. Частота встречаемости каждого из этих субтипов варьирует не только в разных географических зонах, но и в группах риска. Субтипы 1b, 2a и 2b преобладают у пациентов старшего возраста, имеющих в анамнезе переливание крови, хирургические, внутривенные вмешательства или контакты с препаратами крови, тогда как субтипы 1a и 3a ассоциированы с внутривенным введением наркотических средств.

Инфицирование HCV приводит к развитию ОГС, в 50—80% случаев протекающего в безжелтушной форме без клинических проявлений, в результате чего острую фазу (ОГС) заболевания диагностируют редко. Инкубационный период при ОГС колеблется от 2 до 26 нед (в среднем 6—8 нед). Клинические симптомы ОГС не имеют принципиальных отличий от таковых при других парентеральных гепатитах. Длительность преджелтушного периода составляет от нескольких дней до 2 нед; он может отсутствовать у 20% больных. ОГС протекает преимущественно в среднетяжелой форме, у 30% больных — в легкой. Возможно тяжелое течение болезни (редко), а фульминантный ОГС, приводящий к летальному исходу. При естественном течении 20-50% больных ОГС спонтанно выздоравливают, у остальных происходит развитие ХГС.

Для диагностики гепатита С доступны как серологические, так и молекулярно-генетические методы исследования. Для диагностики ОГС можно прибегнуть к выявлению вирусной РНК методом ПЦР, так как ее можно обнаружить уже в первые 1—2 нед заболевания, в то время как антитела появляются только через несколько недель. Использование тест-систем III поколения, значительно более чувствительных и специфичных, позволяет выявить анти-HCV в сыворотке крови уже через 7—10 дней от начала желтухи. Анти-HCV можно обнаружить как при ОГС, так и при ХГС. При этом анти-HCV IgM одинаково часто обнаруживают у больных как острым, так и хроническим гепатитом С. Кроме того, анти-HCV могут изолированно циркулировать в крови пациентов, которые выздоровели после ОГС или находятся в фазе ремиссии после элиминации РНК HCV в результате противовирусной терапии. Особенную диагностическую ценность для установления диагноза ОГС имеет обнаружение анти-ВГС в динамике болезни при отрицательном результате исследования в ранние сроки болезни. Современные тест-системы позволяют повысить выявляемость анти-HCV у 98—100% иммунокомпетентных инфицированных лиц.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	рекомбинантные антигены ВГС, соответствующие участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS3, NS4, NS5) областями генома ВГС, сорбированные двумя группами — core-антиген и NS (NS ₃ +NS ₄ +NS ₅) в лунках стрипов полистироловых планшетов с плоским дном для ИФА по 6 стрипов, по краю стрипов нанесена маркировка в виде полос: на стрипах с core-Ag — красного цвета, на стрипах с NS-Ag — синего цвета. Стрипы упакованы отдельно в пакеты.	компл. №3	компл. №3R
		core — 6 стр. NS — 6 стр	core — 6 стр. NS — 6 стр.
Контрольный положительный образец (K ⁺)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость малинового цвета	1 фл. (0,5 мл)	1 фл. (0,5 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость синего цвета.	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)

Конъюгат (концентрат)	антитела диагностические против IgG и IgM человека с пероксидазой хрена; прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (1,0 мл)	-
Конъюгат	антитела диагностические против IgG и IgM человека с пероксидазой хрена; прозрачная жидкость красного цвета	-	1 фл. (12,0 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-T(x25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная, пенящаяся жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин.	1 фл. (40 мл)	1 фл. (40 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	опалесцирующая жидкость сине-фиолетового цвета, допускается выпадение незначительного осадка	1 фл. (12 мл)	1 фл. (12 мл)
Раствор для разведения конъюгата (РРК)	опалесцирующая жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, допускается выпадение незначительного осадка	1 фл. (13 мл)	-
Цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБР)	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (13 мл)	1 фл. (13 мл)
Хромоген (ТМБ)	раствор тетраметилбензидина; прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (1,3 мл)	1 фл. (1,3 мл)
Стоп-реагент	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (12,5 мл)	1 фл. (12,5 мл)
Одноразовые наконечники для автоматических пипеток		16 шт.	

Примечания.

1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-T(x25), ЦБР, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование разных серий этих реагентов или их смешение.

3. Допускается использование ТМБ из разных серий набора.

4. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Принадлежности:

- вспомогательные пластиковые емкости (4 шт.),
- клейкая пленка для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Комплекты № 3, 3R – для подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С путем выявления антител к двум группам антигенов (структурных и неструктурных) при ручной

на установке ИФА или с использованием ИФА-анализаторов открытого типа; рассчитан на проведение 48 анализов, включая контрольные образцы; предусмотрено дробное использование набора.

Комплект набора реагентов позволяют проводить отдельные исследования с использованием необходимого количества стрипов.

Рекомендуется следующая схема внесения контрольных и исследуемых образцов:

Кол-во стрипов одной группы/всего	1/2	2/4	3/6	4/8	5/10	6/12
Кол-во контрольных образцов	6	6	6	6	6	6
Кол-во исслед. образцов	1-5	6-13	14-21	22-29	30-37	38-45

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемых образцах антител к вирусу гепатита С (ВГС), они взаимодействуют с антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок иммуносорбента. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело" связывается с конъюгатом (антитела против иммуноглобулинов человека, конъюгированные с пероксидазой хрена). Комплекс антиген-антитело-конъюгат выявляется в цветной реакции с хромогеном.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Аналитическая специфичность.

Перекрестные иммунологические реакции не наблюдались с образцами биологического материала, содержащими маркеры других заболеваний (гепатиты А, В, Е; ВИЧ, сифилис, мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция).

Интерферирующие вещества (гемоглобин в концентрации до 200 г/л, билирубин в концентрации до 120 мкмоль/л и триглицериды в концентрации 11 ммоль/л) не влияют на результат анализа.

Диагностические характеристики:

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 99,50% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,97% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,40 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,01 % - 100 %

Диагностическая специфичность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,63 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,97 % - 100 %

Диагностическая специфичность на образцах биологического материала

доноров (случайная выборка 10 000 образцов) составила: 99,97 % - 100 %

Коэффициент вариации не более 8%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003), в соответствии с требованиями СанПин 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

K+, K-, PPO содержат азид натрия в безопасной концентрации.

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" относится классу Б (эпидемиологически опасные отходы) – инфицированные и потенциально инфицированные отходы, материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка, плазма (с гепарином, цитратом натрия, ЭДТА) крови человека объемом не менее 20 мкл., препараты, приготовленные из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин). Для исследования образцов альбумина, криопреципитата, интерферона исходные растворы вносить согласно инструкции по применению данного набора, лиофильно высушенные препараты крови предварительно восстановить согласно инструкции по их применению. Препараты иммуноглобулинов перед исследованием развести ФСБ-Т в соотношении 1:5. Образцы до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С. При необходимости более длительного хранения образцов сыворотки и плазмы рекомендуется разделить их на аликвоты и хранить при температуре от минус 20 до минус 70 °С. Размороженные образцы перед исследованием нужно тщательно перемешать.

При работе с размороженными образцами следует учитывать, что каждый цикл оттаивания-замораживания приводит к разрушению выявляемых антител, снижая качество исследуемого материала. С целью получения достоверных результатов исследования рекомендуется использовать только однократное замораживание-оттаивание образцов.

Для исключения ложноположительных результатов не рекомендуется анализировать сыворотки с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Достоверность результатов анализа зависит от строгого соблюдения следующих правил:

- Используйте реагенты только данной серии набора (кроме ФСБ-Т(х25), ЦБР, ТМБ, стоп-реагента).
- Не используйте набор с истекшим сроком годности.
- В работе применяйте воду очищенную, соответствующую ФС.2.2.0020.18.
- Не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгата.
- Стеклопосуду тщательно мойте и ополаскивайте водой очищенной или используйте одноразовую посуду.
- Аккуратно разводите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металла. Поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и растворами субстратов.
- Используйте для внесения каждой пробы сменный одноразовый наконечник.
- Никогда не используйте одну и ту же емкость, для приготовления конъюгата и раствора ТМБ.
- Проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы.

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин,

Термостат на 37 °С,

Термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий встряхивание при 500 об/мин и поддерживающий температуру 37°С

Холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Анализатор иммуноферментный автоматический.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С. Иммуносорбент выдерживать в упакованном виде, для того чтобы избежать конденсации влаги внутри лунок.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

Используйте соотношения ФСБ-Т(х25) и воды очищенной, приведенные в таблице 1 для заданного числа стрипов.

Таблица 1

Кол-во стрипов	2	4	6	8	10	12
ФСБ-Т(х25), мл	7	13	20	27	33	40
Вода очищ., мл	до 175	до 325	до 500	до 675	до 825	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 190 сут, при температуре от 18 до 25 °С – не более 30 суток.

Приготовление рабочего раствора конъюгата (Комплект №3)

Готовить не менее чем за 10-20 мин до использования.

Конъюгат (концентрат) развести в РРК, используя объемы, указанные в таблице 2 для заданного числа стрипов. Необходимый объем РРК перенести в одноразовую емкость и добавить конъюгат в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 2

Кол-во стрипов	2	4	6	8	10	12
РРК, мл	2	4	6	8	10	12
Конъюгат (концентрат), мкл	...	...	...	...	...	...

Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК, определяется для каждой серии тест-системы.

Стабильность рабочего раствора конъюгата при температуре от 2 до 8 °С не более 30 сут, при температуре от 18 до 25 °С не более 7 сут. в защищенном от света месте.

Приготовление раствора хромогена (ТМБ)

Готовить перед использованием в месте, защищенном от воздействия прямого солнечного света.

ТМБ развести в ЦБР, используя объемы, указанные в таблице 3 для заданного числа стрипов. Необходимый объем ЦБР перенести в одноразовую емкость и добавить ТМБ в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 3

Число стрипов	2	4	6	8	10	12
ЦБР, мл	2	4	6	8	10	12
ТМБ, мл	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2

Стабильность раствора хромогена при температуре от 18 до 25 °С не более 13 ч. в защищенном от света месте.

Примечание: Посуду и наконечники пипеток, контактировавшие с раствором хромогена, отмывать без применения синтетических моющих средств.

Приготовление остальных реагентов

РРО перед использованием необходимо тщательно перемешать из-за возможного выпадения осадка; иммуносорбент, K^+ , K^- , конъюгат (Комплект №3R), стоп-реагент готовы к использованию.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты хранить в плотно закрытой упаковке при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Проведение ИФА

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из пакета планшет, вскрыв выше замка «zip-lock», и установить на рамку необходимое для проведения ИФА количество стрипов. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник.

Хранение вскрытого иммуносорбента возможно при температуре 2-8 °С до истечения срока годности набора.

Расположить стрипы в рамке, в соответствии со схемой постановки.

	core	NS	core	NS	core	NS	core	NS	core	NS	core	NS
A	K+	K+	№6	№6	№14	№14	№22	№22	№30	№30	№38	№38
B	K-	K-	№7	№7	№15	№15	№23	№23	№31	№31	№39	№39
C	K-	K-	№8	№8	№16	№16	№24	№24	№32	№32	№40	№40
D	№1	№1	№9	№9	№17	№17	№25	№25	№33	№33	№41	№41
E	№2	№2	№10	№10	№18	№18	№26	№26	№34	№34	№42	№42
F	№3	№3	№11	№11	№19	№19	№27	№27	№35	№35	№43	№43
H	№4	№4	№12	№12	№20	№20	№28	№28	№36	№36	№44	№44
G	№5	№5	№13	№13	№21	№21	№29	№29	№37	№37	№45	№45

2. В каждую лунку вносят по 80 мкл РРО.

3. В каждую лунку стрипа с каждым антигеном (например, А) вносят по 20 мкл K^+ , в две лунки (например, В и С) – по 20 мкл K^- , в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов, затем тщательно перемешать пипетированием (не менее 3 раз) или на шейкере на малой скорости (100 об/мин) в течение 30 с, цвет РРО при этом должен измениться с сине-фиолетового на зеленый.

4. Планшет закрывают крышкой или клейкой пленкой.

Инкубируют согласно выбранной процедуре:

Процедура №1 - 30 мин при 37°C на шейкере (500 об/мин), либо

Процедура №2 - 1 ч при 37 °C в термостате.

5. По окончании инкубации аспирируют содержимое лунок и промывают лунки планшета 4 раза промывочным раствором, добавляя в каждую лунку не менее 400 мкл жидкости. Время между заполнением и аспирацией (замачивание) должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки удалить влагу из лунок, постукивая планшетом по фильтрованной бумаге.

Рекомендуется использовать:

- режим отмывки с переполнением – «overflow» - с внесением в лунки по 600-700 мкл рабочего промывочного раствора;

- поперечную аспирацию раствора из лунок – режим «crosswise».

Необходимо следить за полной аспирацией после каждого цикла отмывки (остаточный объем в лунках не должен превышать 10 мкл). Сохранность иммуносорбента между операциями 15 минут.

6. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата (Комплект №3R) или рабочего раствора конъюгата (Комплект №3). Планшет закрывают крышкой или пленкой и выдерживают при температуре 37 °C 30 мин в термостате.

7. Планшет промывают ФСБ-Т 6 раз с использованием обычного промывающего устройства или 4 раза в режиме "overflow" (см. п. 5).

8. В каждую лунку внести по 100 мкл свежеприготовленного раствора хромогена., выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °C в защищенном от света месте (планшет не закрывать) или в термостате при температуре 37 °C в течение 15 мин. (планшет закрыть чистой защитной пленкой).

9. В каждую лунку (в той же последовательности, в которой вносился раствор хромогена) внести по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты, но не позднее, чем через 40 минут учесть результаты реакции.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при соблюдении следующих условий:

оптическая плотность в лунках с K^+ (ОП_{K+}) - не менее 0,5;

оптическая плотность в лунках с K^- (ОП_{K-}) - не более 0,25.

В противном случае исследование повторить.

Рассчитать критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{К-ср} + 0,150;$$

где $ОП_{К-ср}$ – среднее значение ОП в лунках с K^- .

Результаты учитывать по каждой группе антигенов отдельно.

Образец учитывать как отрицательный (не содержащий антител к ВГС), если значение ОП в лунке с ним ниже $ОП_{крит}$ для каждой группы антигенов.

Образец учитывать как положительный (содержащий антитела к ВГС), если значение ОП в лунке с ним выше или равно $ОП_{крит}$ по обеим группам антигенов или только по группе структурных антигенов (core) ВГС.

Образцы с ОП, большей или равной $ОП_{крит}$ только по группе неструктурных антигенов (NS) ВГС, считают неопределенными. Неопределенные образцы должны быть исследованы в других подтверждающих тестах (иммуноблотинг, ПЦР-анализ) или повторным исследованием сыворотки (плазмы) крови данного пациента в системе "ИФА-ВГС" через 3-6 мес.

Для интерпретации результатов исследования сывороток можно использовать коэффициент позитивности (КП), который рассчитывается по формуле:

$$КП = \frac{ОП_{иссл.сыв.}}{ОП_{крит.}}$$

Если $КП \geq 1,0$, исследуемый образец расценивать как положительный. Результат анализа считать отрицательным при $КП < 1,0$.

Все положительные образцы должны быть исследованы в подтверждающих ПЦР-тестах.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

Спектрофотометрический контроль стадий ИФА при постановке на автоматических анализаторах.

Контроль внесения исследуемых образцов и рабочего раствора конъюгата проводить при длине волны 450

нм. При этом $ОП > 0,1$.

Контроль внесения рабочего раствора хромогена проводить при длине волны 450 нм.

При этом $ОП > 0,08$.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 2 года для комплекта №3, 1 год для комплекта №3R.

Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Транспортирование

Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на

транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 15 сут. Замораживание не допускается.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС», соответствует Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности (см. Сведения о нормативной документации).

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ИФА-ВГС», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. 8 (49643) 3-23-11, 3-30-93, тел/факс 8(49643) 3-30-85, 8 (800) 333-33-47.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по науке



С.Г.Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

«14» 01 2021 г.



П.К. Варнавичус

СВОДНАЯ ТАБЛИЦА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ РЕАГЕНТОВ

Кол-во стрипов	2	4	6	8	10	12
ФСБ-Т						
ФСБ-Т(х25), мл	7	13	20	27	33	40
Вода очищ., мл	до 175	до 325	до 500	до 675	до 825	до 1000
Рабочий раствор конъюгата						
РРК, мл	2	4	6	8	10	12
Конъюгат (концентрат) ¹ , мкл	...	...	...	...	...	...
Раствор хромогена						
ЦБР, мл	2	4	6	8		12
ТМБ, мл	0,1	0,2	0,3	0,4		0,5

¹Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК; указывается для каждой серии тест-системы.

КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

«ИФА-ВГС»

Комплект № 3, №3R

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в каждую лунку – по 80 мкл РРО; в одну лунку стрипа с каждой группой антигенов – 20 мкл K ⁺ , в две лунки – по 20 мкл K ⁻ , в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов
Инкубация	Процедура 1 30 мин при 37 °С на шейкере (500 об/мин) или Процедура 2 1 ч при 37 °С, в термостате
Промыть	4 раза ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 100 мкл конъюгата (Комплект №3R) или рабочего раствора конъюгата (Комплект №3)
Инкубация	30 мин, 37 °С в термостате
Промыть	4 раза в режиме "overflow" или 6 раз ФСБ-Т (обычное промывающее устройство)
Внести	по 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 18-25 °С или в термостате при температуре 37 °С в течение 15 мин
Внести	по 100 мкл стоп-реактанта в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), "бланк" - по воздуху

ПРОШИТО

В КОЛИЧЕСТВЕ 11 ЛИСТОВ

« 14 » 01 2022 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

11 лист 06

Ген. директор ЗАО "ЭКОлаб"
Гашенко Т.Ю.

« 14 » 01 2022 г.



"УТВЕРЖДАЮ"



Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"

Т.Ю.Гашенко
2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу
гепатита С»
«ИФА-ВГС»

Комплекты № 2/3, 2/4

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС-подтверждающий» предназначен для качественного выявления и подтверждения наличия антител классов IgG и IgM к антигенам вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке (плазме) крови человека, а также препаратах, приготовленных из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин) методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Функциональное назначение: скрининг, подтверждение и диагностика. Применение изделия не имеет популяционных и демографических ограничений.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики in vitro.

Показания и противопоказания к применению изделия

Основные показания к применению: профилактическое обследование доноров, лиц из групп риска, при подготовке к госпитализации, оперативному вмешательству, беременности, диагностика острой фазы гепатита С, диагностика хронического гепатита С.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Вирус гепатита С (ВГС, HCV) — антропоноз; единственный источник (резервуар) возбудителя инфекции — человек, больной острым или хроническим гепатитом. ВГС относится к кровоконтактным инфекциям. Механизмы заражения: естественный (вертикальный — при передаче вируса от матери к ребенку, контактный — при использовании предметов быта и при половых контактах) и искусственный (артифициальный). Искусственный путь заражения может быть реализован посредством гемотрансфузий инфицированной крови или ее препаратов и любых парентеральных манипуляций (медицинского и немедицинского характера), сопровождающихся нарушением целостности кожного покрова и слизистых оболочек.

Вирус гепатита С относится к семейству Flaviviridae, роду Hepacivirus. Геном ВГС представлен однонитевой позитивной цепью РНК, длиной около 9600 нуклеотидных оснований (н.о.). Терминальные части генома ВГС представлены 5' и 3' нетранслируемыми регионами. Вирусная РНК содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин-предшественник размером 3010-3033 аминокислотных остатков, из которого в результате процессинга образуются структурные (core, E1, E2, p7) и неструктурные (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) белки. Структурные белки формируют вирусную частицу. Неструктурные белки участвуют в репликации генома ВГС и процессинге полипротеина-предшественника. Современная классификация включает 7 генотипов (1–7), подразделенных на

субтипов (а, b, с и т.д.), а также 9 межгенотипных рекомбинантных форм. Наибольшее распространение получили всего 6 субтипов ВГС (1а, 1b, 2а, 2b, 2с, 3а), которые признаны эпидемическими вариантами, обусловившими глобальное распространение инфекции на протяжении XX в. Частота встречаемости каждого из этих субтипов варьирует не только в разных географических зонах, но и в группах риска. Субтипы 1b, 2а и 2b преобладают у пациентов старшего возраста, имеющих в анамнезе переливание крови, хирургические, внутривенные вмешательства или контакты с препаратами крови, тогда как субтипы 1а и 3а ассоциированы с внутривенным введением наркотических средств.

Инфицирование HCV приводит к развитию ОГС, в 50—80% случаев протекающего в безжелтушной форме без клинических проявлений, в результате чего острую фазу (ОГС) заболевания диагностируют редко. Инкубационный период при ОГС колеблется от 2 до 26 нед (в среднем 6—8 нед). Клинические симптомы ОГС не имеют принципиальных отличий от таковых при других парентеральных гепатитах. Длительность преджелтушного периода составляет от нескольких дней до 2 нед; он может отсутствовать у 20% больных. ОГС протекает преимущественно в среднетяжелой форме, у 30% больных — в легкой. Возможно тяжелое течение болезни (редко), а фульминантный ОГС, приводящий к летальному исходу. При естественном течении 20-50% больных ОГС спонтанно выздоравливают, у остальных происходит развитие ХГС.

Для диагностики гепатита С доступны как серологические, так и молекулярно-генетические методы исследования. Для диагностики ОГС можно прибегнуть к выявлению вирусной РНК методом ПЦР, так как ее можно обнаружить уже в первые 1—2 нед заболевания, в то время как антитела появляются только через несколько недель. Использование тест-систем III поколения, значительно более чувствительных и специфичных, позволяет выявить анти-HCV в сыворотке крови уже через 7—10 дней от начала желтухи. Анти-HCV можно обнаружить как при ОГС, так и при ХГС. При этом анти-HCV IgM одинаково часто обнаруживают у больных как острым, так и хроническим гепатитом С. Кроме того, анти-HCV могут изолированно циркулировать в крови пациентов, которые выздоровели после ОГС или находятся в фазе ремиссии после элиминации РНК HCV в результате противовирусной терапии. Особенную диагностическую ценность для установления диагноза ОГС имеет обнаружение анти-ВГС в динамике болезни при отрицательном результате исследования в ранние сроки болезни. Современные тест-системы позволяют повысить выявляемость анти-HCV у 98—100% иммунокомпетентных инфицированных лиц.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Базовые варианты комплектации включают:

Иммуносорбент	в лунках стрипов иммобилизованы антигены ВГС на горизонтальных рядах: А, Е иммобилизован core-антиген, на рядах В, F - NS ₃ -антиген, на рядах С, G - NS ₄ антиген, на рядах D, H - неструктурный NS ₅ -антиген	Комп. №2/3	Комп. № 2/4
		1 шт.	5 шт.
Контрольный положительный образец (K ⁺)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость малинового цвета	1 фл. (0,5 мл)	1 фл. (3,0 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость синего цвета	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (4,0 мл)
Конъюгат (концентрат)	антитела диагностические против IgG и IgM человека с пероксидазой хрена; прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (1,5 мл)	1 фл. (5,0 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная, пенящаяся жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	1 фл. (40 мл)	2 фл. (по 100 мл)

Раствор для разведения образцов (РРО)	опалесцирующая жидкость сине-фиолетового цвета, допускается выпадение незначительного осадка	1 фл. (13 мл)	5 фл. (по 15 мл)
Раствор для разведения конъюгата (РРК)	опалесцирующая жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, допускается выпадение незначительного осадка	1 фл. (13 мл)	5 фл. (по 20 мл)
Цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБР)	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (13 мл)	5 фл. (по 20 мл)
Хромоген (ТМБ)	раствор тетраметилбензидина; прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (1,3 мл)	1 фл. (11 мл)
Стоп-реагент	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (12,5 мл)	1 фл. (70 мл)
Одноразовые наконечники для автоматических пипеток		16 шт.	32 шт.

Примечания.

1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(х25), ЦБР, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование разных серий этих реагентов или их смешение.

3. Допускается использование ТМБ из разных серий набора.

4. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Принадлежности:

- вспомогательные пластиковые емкости: Комплект №2/3 - 4 шт., Комплект №2/4 – 8 шт.

- клейкая пленка для планшетов: Комплект №2/3 - 4 шт., Комплект №2/4 – 8 шт.

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Комплект № 2/3 - для подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С путем выявления спектра антител к каждому из антигенов отдельно при ручной постановке ИФА; рассчитан на проведение 24 анализов, включая контрольные образцы или для одновременной постановки 24 определений на автоматических анализаторах для ИФА открытого типа; предусмотрено детальное использование набора.

Комплекта № 2/4 - для подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С путем выявления спектра антител к каждому из антигенов отдельно при ручной постановке ИФА или с использованием ИФА-анализатора открытого типа; рассчитан на проведение 120 анализов, включая контрольные образцы; предусмотрено детальное использование набора.

Комплекты набора реагентов позволяют проводить отдельные исследования с использованием необходимого количества стрипов.

Рекомендуется следующая схема внесения контрольных и исследуемых образцов:

Кол-во стрипов	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Кол-во контр-х образцов	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Кол-во иссл-х образцов	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемых образцах антител к вирусу гепатита С (ВГС), они взаимодействуют с антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок иммуносорбента. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело" связывается с конъюгатом (антитела против иммуноглобулинов человека, конъюгированные с пероксидазой хрена). Комплекс антиген-антитело-конъюгат выявляется в цветной реакции с хромогеном.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Аналитическая специфичность.

Перекрестные иммунологические реакции не наблюдались с образцами биологического материала, содержащими маркеры других заболеваний (гепатиты А, В, Е; ВИЧ, сифилис, мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция).

Интерферирующие вещества (гемоглобин в концентрации до 200 г/л; билирубин в концентрации до 120 мкмоль/л и триглицериды в концентрации 11 ммоль/л) не влияют на результат анализа.

Диагностические характеристики:

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 99,50% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,97% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,40 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,01 % - 100 %

Диагностическая специфичность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,63 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,97 % - 100 %

Диагностическая специфичность на образцах биологического материала доноров (случайная выборка 10 000 образцов) составила: 99,97 % - 100 %

Коэффициент вариации не более 8%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003), в соответствии с требованиями СанПин 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

К+, К-, РРО содержат азид натрия в безопасной концентрации.

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" относится классу Б (эпидемиологически опасные отходы) – инфицированные и потенциально инфицированные отходы, материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка, плазма (с гепарином, цитратом натрия, ЭДТА) крови человека объемом не менее 20 мкл., препараты, приготовленные из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин). Для исследования образцов альбумина, криопреципитата, интерферона исходные растворы вносить согласно инструкции по применению данного набора, лиофильно высушенные препараты крови предварительно восстановить согласно инструкции по их применению. Препараты иммуноглобулинов перед исследованием развести ФСБ-Т в соотношении 1:5. Образцы до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С. При необходимости более длительного хранения образцов сыворотки и плазмы рекомендуется разделить их на аликвоты и хранить при температуре от минус 20 до минус 70 °С. Размороженные образцы перед исследованием нужно тщательно перемешать.

При работе с размороженными образцами следует учитывать, что каждый цикл оттаивания-замораживания приводит к разрушению выявляемых антител, снижая качество исследуемого материала. С целью получения достоверных результатов исследования рекомендуется использовать только однократное замораживание-оттаивание образцов.

Для исключения ложноположительных результатов не рекомендуется анализировать сыворотки с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным простом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Достоверность результатов анализа зависит от строгого соблюдения следующих правил:

- Используйте реагенты только данной серии набора (кроме ФСБ-Т(х25), ЦБР, ТМБ, стоп-реагента).
- Не используйте набор с истекшим сроком годности.

- В работе применяйте воду очищенную, соответствующую ФС.2.2.0020.18.
- Не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгата.
- Стекланную посуду тщательно мойте и ополаскивайте водой очищенной или используйте одноразовую посуду.
- Аккуратно разводите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металла. Поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и растворами субстратов.
- Используйте для внесения каждой пробы сменный одноразовый наконечник.
- Никогда не используйте одну и ту же емкость, для приготовления конъюгата и раствора ТМБ.
- Проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы.

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин,

Термостат на 37 °С,

Термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий встряхивание при 500 об/мин и поддерживающий температуру 37°С

Холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Анализатор иммуноферментный автоматический.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

1.2. Приготовление растворов и реагентов для ИФА

Все реагенты до начала анализа должны быть выдержаны не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С. Иммуносорбент выдерживать в упакованном виде, для того чтобы избежать конденсации влаги внутри лунок.

1.2.1. Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в концентрате его необходимо прогреть перед разведением при 37 °С до полного растворения осадка.

В зависимости от числа используемых стрипов используйте соотношения ФСБ-Т(х25) и воды очищенной, приведенные в табл.

Таблица 1

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т(х25),мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищ., мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 190 сут, при температуре от 18 до 25 °С – не более 30 суток.

1.2.2. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовить не менее чем за 10-20 мин до использования.

Конъюгат (концентрат) развести в РРК, используя объемы, указанные в таблице 2 для заданного числа стрипов. Необходимый объем РРК перенести в одноразовую емкость и добавить конъюгат в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 2

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
РРК, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Конъюгат (концентрат), мкл	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360

Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК, определяется для каждой серии тест-системы.

Стабильность рабочего раствора конъюгата при температуре от 2 до 8 °С не более 30 сут, при температуре от 18 до 25 °С не более 7 сут. в защищенном от света месте.

1.2.3. Приготовление раствора хромогена

Готовить перед использованием в месте, защищенном от воздействия прямого солнечного света.

ТМБ развести в ЦБР, используя объемы, указанные в таблице 3 для заданного числа стрипов. Необходимый объем ЦБР перенести в одноразовую емкость и добавить ТМБ в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 3

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ТМБ, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,1	1,2

Стабильность раствора хромогена при температуре от 18 до 25 °С не более 13 ч. в защищенном от света месте.

Примечание: Посуду и наконечники пипеток, контактировавшие с раствором хромогена, мыть без применения синтетических моющих средств.

1.2.4. Приготовление остальных реагентов

РРО перед использованием необходимо тщательно перемешать из-за возможного выпадения осадка. Иммуносорбент, K^+ , K^- , стоп-реагент готовы к использованию.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

1.3. Проведение ИФА

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1.3.1. Извлечь из пакета планшет, вскрыв его выше замка «zip-lock» и установить на рамку необходимое для проведения ИФА количество стрипов. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник. Хранение вскрытого иммуносорбента возможно при температуре 2-8°С до истечения срока годности набора.

Рекомендуемая схема постановки ИФА (горизонтальное нанесение антигенов)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Исследуемые образцы											
A	core	K^+	№1	№3	№5	№7	№9	№11	№13	№15	№17	№19	№21
B	NS ₃	K^+	№1	№3	№5	№7	№9	№11	№13	№15	№17	№19	№21
C	NS ₄	K^+	№1	№3	№5	№7	№9	№11	№13	№15	№17	№19	№21
D	NS ₅	K^+	№1	№3	№5	№7	№9	№11	№13	№15	№17	№19	№21
E	core	K^-	№2	№4	№6	№8	№10	№12	№14	№16	№18	№20	№22
F	NS ₃	K^-	№2	№4	№6	№8	№10	№12	№14	№16	№18	№20	№22
G	NS ₄	K^-	№2	№4	№6	№8	№10	№12	№14	№16	№18	№20	№22

H	NS ₅	K ⁻	№2	№4	№6	№8	№10	№12	№14	№16	№18	№20	№22
---	-----------------	----------------	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1.3.2. В лунках стрипов на рядах A, E иммобилизован core-антиген, на рядах B, F - NS₃ - антиген, на рядах C, G - NS₄ - антиген, на рядах D, H - неструктурный NS₅- антиген. Поэтому все контроли и исследуемые образцы вносят в четыре лунки вертикального ряда для проведения реакции с каждым антигеном согласно схеме №2.

1.3.3. В каждую лунку внести по 80 мкл РРО.

1.3.4. В четыре лунки (A1, B1, C1, D1) стрипа с каждым антигеном внести 20 мкл K⁺, в четыре (E1, F1, G1, H1) – по 20 мкл K⁻, в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов (см. схему №2), т.е. в соответствии с внесенным объемом РРО (п.1.3.3) тщательно перемешать пипетированием (не менее 3 раз) или на шейкере на малой скорости в течение 30 с (100 об/мин), цвет РРО при этом должен измениться с сине-фиолетового на зеленый или с красного на желтый.

1.3.5. Планшет закрыть крышкой или пленкой и инкубировать в соответствии с выбранной процедурой:

процедура 1 – 30 мин при 37 °С на шейкере (500 об/мин);

процедура 2 – 1 ч при 37 °С в термостате.

1.3.6. По окончании инкубации аспирировать содержимое лунок и промыть лунки планшета четыре раза, добавляя в каждую лунку не менее 400 мкл рабочего промывочного раствора. Время между заполнением и аспирацией (замачивание) должно быть не менее 30 сек.

Рекомендуется использовать:

- режим отмывки с переполнением – «overflow» - с внесением в лунки по 600-700 мкл рабочего промывочного раствора;

- поперечную аспирацию раствора из лунок – режим «crosswise».

Необходимо следить за полной аспирацией после каждого цикла отмывки (остаточный объем в лунках не должен превышать 10 мкл).

Полностью удалить влагу из лунок, перевернув планшет на сухую чистую фильтровальную бумагу.

Сохранность иммуносорбента между операциями 15 минут.

1.3.7. Перемешать рабочий раствор конъюгата и внести его по 100 мкл в каждую лунку. Планшет закрыть крышкой или пленкой и выдержать в течение 30 мин в термостате при температуре 37 °С.

1.3.8. Стрипы промыть ФСБ-Т 6 раз с использованием обычного промывающего устройства или 4 раза в режиме "overflow" (см. п. 1.3.5).

1.3.9. В каждую лунку внести по 100 мкл свежеприготовленного раствора хромогена, выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте (планшет не закрывать) или в термостате при температуре 37 °С в течение 15 мин. (планшет закрыть чистой защитной пленкой).

1.3.10. В каждую лунку (в той же последовательности, в которой вносился раствор хромогена) внести по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты, но не позднее, чем через 40 минут учесть результаты реакции.

1.4. Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референсфильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при соблюдении следующих условий:

ОП в лунках с K⁺ (ОП_{K+}) - не менее 0,5;

ОП в лунках с K⁻ (ОП_{K-}) - не более 0,25.

В противном случае исследование повторить.

Для каждого антигена рассчитать критическое значение ОП (ОП_{крит}) по формуле:

$ОП_{крит} = ОП_{K-ср} + 0,150;$

где ОП_{K-ср} - значение ОП в лунках с K⁻ соответствующего стрипа.

Результаты учитывать по каждому антигену отдельно.

Образец учитывать как отрицательный (не содержащий антител к ВГС), если значение ОП в лунке с ним ниже ОП_{крит} для каждого антигена.

Образец учитывать как положительный (содержащий антитела к ВГС), если значение ОП в лунке с ним выше или равно ОП_{крит} по двум или более антигенам, а также по одному Core-антигену.

Образец учитывать как сомнительный, если значение ОП в лунке с ним выше или равно ОП_{крит} только по одному неструктурному (NS₃, NS₄ или NS₅) антигену.

Образцы с ОП, большей или равной ОП_{крит} только по одному неструктурному (NS₃, NS₄ или NS₅) антигену, считают неопределенными. Неопределенные образцы должны быть исследованы в других подтверждающих тестах (иммуноблотинг, ПЦР-анализ) или повторным исследованием сыворотки (плазмы) крови данного пациента в системе "ИФА-ВГС" через 3-6 месяцев.

Для интерпретации результатов исследования сывороток можно использовать коэффициент позитивности (КП), который рассчитывается для каждого антигена отдельно по формуле:

$$КП = \frac{ОП_{иссл.сыв.}}{ОП_{крит.}}$$

Если КП $\geq 1,0$ по двум или более антигенам, а также по одному Core-антигену, исследуемый образец расценивать как положительный.

Если КП $< 1,0$ для каждого антигена образец расценивать как отрицательный.

Образец учитывать как сомнительный, если значение КП $\geq 1,0$ только по одному неструктурному (NS₃, NS₄ или NS₅) антигену.

2. Постановка с использованием автоматического ИФА-анализатора

2.1. Приготовление растворов и реагентов для ИФА

Приготовить ФСБ-Т, рабочий раствор конъюгата и раствор хромогена, используя реагенты и их соотношения, указанные в табл. 4 для проведения исследования на одном планшете.

Таблица 4

ФСБ-Т		Рабочий раствор конъюгата		Раствор хромогена	
ФСБ-Т(x25), мл	Вода очи- щенная, мл	Конъюгат (концен- трат) ¹ , мкл	РРК, мл	ТМБ, мл	ЦБР, мл
40	до 1000	600	20 мл	2,0	20

¹ Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК, определяется для каждой серии тест-системы.

2.2. Проведение ИФА

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, задать программу проведения ИФА и провести исследование.

Спектрофотометрический контроль стадий ИФА при постановке на автоматических анализаторах:

Контроль внесения исследуемых образцов и рабочего раствора конъюгата проводить при длине волны 450 нм. При этом ОП $> 0,1$.

Контроль внесения рабочего раствора хромогена проводить при длине волны 450 нм. При этом ОП $> 0,08$.

СРОК ГОДНОСТИ.

Срок годности набора – 2 года. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых паковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Транспортирование

Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 15 сут. Замораживание не допускается.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС-подтверждающий», соответствует Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности (см. Сведения о нормативной документации).

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ИФА-ВГС», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. 8 (49643) 3-23-11, 3-30-93, тел/факс 8(49643) 3-30-85, 8 (800) 333-33-47.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по науке

С.Г. Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

«14» 01 2021 г.

И.К. Варнавичус

СВОДНАЯ ТАБЛИЦА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ РЕАГЕНТОВ

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т												
ФСБ-Т(х25), мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищ., мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000
Рабочий раствор конъюгата												
РРК, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Конъюгат (кон- центрат) ¹ , мкл	...	...					...		...	...	...	...
Раствор хромогена												
ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ТМБ, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,1	1,2

¹Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК, определяется для каждой серии тест-системы.

КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА ("ИФА-ВГС", комплекты № 2/3, 2/4)

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в каждую лунку – по 80 мкл РРО; в первую лунку стрипа с каждым антигеном - 20 мкл К ⁺ , во вторую - 20 мкл К ⁻ , в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов в зависимости от внесенного объема РРО
Инкубация	Процедура 1 30 мин при 37 °С на шейкере (500 об/мин) или Процедура 2 1 ч при 37 °С, в термостате
Промыть	4 раза ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата
Инкубация	30 мин, 37, °С в термостате
Промыть	4 раза в режиме "overflow" или 6 раз ФСБ-Т (обычное промывающее устройство)
Внести	по 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 18-25 °С или в термостате при температуре 37 °С в течение 15 мин
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по воздуху



ПРОШНО
В КОЛИЧЕСТВЕ 11 ЛИСТОВ

« 14 » 06 2022 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью



11 лист об
Ген. директор ЗАО "ЭКОлаб"
Гашенко Т.Ю.
" 14 " 06 / 2022 г.

"УТВЕРЖДАЮ"



Т.Ю. Гашенко
2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к
вирусу гепатита С»
«ИФА-ВГС»

Комплект № 3/1
для подтверждения наличия антител к антигенам вируса гепатита С

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС» предназначен для качественного выявления и подтверждения наличия антител классов IgG и IgM к антигенам вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке (плазме) крови человека, а также препаратах, приготовленных из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин) методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Функциональное назначение: скрининг, подтверждение и диагностика. Применение изделия не имеет популяционных и демографических ограничений.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики *in vitro*.

Показания и противопоказания к применению изделия

Основные показания к применению: профилактическое обследование доноров, лиц из групп риска, при подготовке к госпитализации, оперативному вмешательству, беременности, диагностика острой фазы гепатита С, диагностика хронического гепатита С.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Вирус гепатита С (ВГС, HCV) — антропоноз; единственный источник (резервуар) возбудителя инфекции — человек, больной острым или хроническим гепатитом. ВГС относится к кровоконтактным инфекциям. Механизмы заражения: естественный (вертикальный — при передаче вируса от матери к ребенку, контактный — при использовании предметов быта и при половых контактах) и искусственный (артифициальный). Искусственный путь заражения может быть реализован посредством гемотрансфузий инфицированной крови или ее препаратов и любых парентеральных манипуляций (медицинского и немедицинского характера), сопровождающихся нарушением целостности кожного покрова и слизистых оболочек.

Вирус гепатита С относится к семейству *Flaviviridae*, роду *Hepacivirus*. Геном ВГС представлен однонитевой позитивной цепью РНК, длиной около 9600 нуклеотидных оснований (н.о.). Терминальные части генома ВГС представлены 5' и 3' нетранслируемыми регионами. Вирусная РНК содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин-предшественник размером 3010-3033 аминокислотных остатков, из которого в результате процессинга образуются структурные (core, E1, E2, p7) и неструктурные (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) белки. Структурные белки формируют вирусную частицу. Неструктурные белки участвуют в репликации генома ВГС и процессинге по-

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор

ЗАО "ЭКОлаб"

Т.Ю.Гашенко

2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к
вирусу гепатита С»
«ИФА-ВГС»

Комплект № 3/1
для подтверждения наличия антител к антигенам вируса гепатита С

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС» предназначен для качественного выявления и подтверждения наличия антител классов IgG и IgM к антигенам вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке (плазме) крови человека, а также препаратах, приготовленных из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин) методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Функциональное назначение: скрининг, подтверждение и диагностика. Применение изделия не имеет популяционных и демографических ограничений.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики in vitro.

Показания и противопоказания к применению изделия

Основные показания к применению: профилактическое обследование доноров, лиц из групп риска, при подготовке к госпитализации, оперативному вмешательству, беременности, диагностика острой фазы гепатита С, диагностика хронического гепатита С.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Вирус гепатита С (ВГС, HCV) — антропоноз; единственный источник (резервуар) возбудителя инфекции — человек, больной острым или хроническим гепатитом. ВГС относится к кровоконтактным инфекциям. Механизмы заражения: естественный (вертикальный — при передаче вируса от матери к ребенку, контактный — при использовании предметов быта и при половых контактах) и искусственный (артифициальный). Искусственный путь заражения может быть реализован посредством гемотрансфузий инфицированной крови или ее препаратов и любых парентеральных манипуляций (медицинского и немедицинского характера), сопровождающихся нарушением целостности кожного покрова и слизистых оболочек.

Вирус гепатита С относится к семейству Flaviviridae, роду Hepacivirus. Геном ВГС представлен однократной позитивной цепью РНК, длиной около 9600 нуклеотидных оснований (н.о.). Терминальные части генома ВГС представлены 5' и 3' нетранслируемыми регионами. Вирусная РНК содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин-предшественник размером 3010-3033 аминокислотных остатков, из которого в результате процессинга образуются структурные (core, E1, E2, p7) и неструктурные (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) белки. Структурные белки формируют вирусную частицу. Неструктурные белки участвуют в репликации генома ВГС и процессинге по-

белка-предшественника. Современная классификация включает 7 генотипов (1–7), подразделенных на 88 субтипов (a, b, c и т.д.), а также 9 межгенотипных рекомбинантных форм. Наибольшее распространение получили всего 6 субтипов ВГС (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a), которые признаны эпидемическими вариантами, обусловившими глобальное распространение инфекции на протяжении XX в. Частота встречаемости каждого из этих субтипов варьирует не только в разных географических зонах, но и в группах риска. Субтипы 1b, 2a и 2b преобладают у пациентов старшего возраста, имеющих в анамнезе переливание крови, хирургические, внутривенные вмешательства или контакты с препаратами крови, тогда как субтипы 1a и 3a ассоциированы с внутривенным введением наркотических средств.

Инфицирование HCV приводит к развитию ОГС, в 50–80% случаев протекающего в безжелтушной форме без клинических проявлений, в результате чего острую фазу (ОГС) заболевания диагностируют редко. Инкубационный период при ОГС колеблется от 2 до 26 нед (в среднем 6–8 нед). Клинические симптомы ОГС не имеют принципиальных отличий от таковых при других парентеральных гепатитах. Длительность преджелтушного периода составляет от нескольких дней до 2 нед; он может отсутствовать у 20% больных. ОГС протекает преимущественно в среднетяжелой форме, у 30% больных — в легкой. Возможно тяжелое течение болезни (редко), а фульминантный ОГС, приводящий к летальному исходу. При естественном течении 20–50% больных ОГС спонтанно выздоравливают, у остальных происходит развитие ХГС.

Для диагностики гепатита С доступны как серологические, так и молекулярно-генетические методы исследования. Для диагностики ОГС можно прибегнуть к выявлению вирусной РНК методом ПЦР, так как ее можно обнаружить уже в первые 1–2 нед заболевания, в то время как антитела появляются только через несколько недель. Использование тест-систем III поколения, значительно более чувствительных и специфичных, позволяет выявить анти-HCV в сыворотке крови уже через 7–10 дней от начала желтухи. Анти-HCV можно обнаружить как при ОГС, так и при ХГС. При этом анти-HCV IgM одинаково часто обнаруживают у больных как острым, так и хроническим гепатитом С. Кроме того, анти-HCV могут изолированно циркулировать в крови пациентов, которые выздоровели после ОГС или находятся в фазе ремиссии после элиминации РНК HCV в результате противовирусной терапии. Особенную диагностическую ценность для установления диагноза ОГС имеет обнаружение анти-ВГС в динамике болезни при отрицательном результате исследования в ранние сроки болезни. Современные тест-системы позволяют повысить выявляемость анти-HCV у 98–100% иммунокомпетентных инфицированных лиц.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Базовый вариант комплекта включает:

Иммуносорбент	в лунках стрипов иммобилизованы антигены ВГС на горизонтальных рядах: А, С, Е, G - антиген, кодируемый структурной (core) областью генома ВГС; на рядах: В, D, F, H – антигены, соответствующие неструктурной (NS) области генома ВГС (NS ₃ +NS ₄ +NS ₅)	1 планшет (12 стрипов)
Контрольный положительный образец (K ⁺)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость малинового цвета	1 фл. (0,5 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость синего цвета	1 фл. (1,0 мл)
Конъюгат (концентрат)	антитела диагностические против IgG и IgM человека с пероксидазой хрена; прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (1,0 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная, пенящаяся жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре 37 °C в течение 30 мин	1 фл. (40 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	опалесцирующая жидкость сине-фиолетового цвета, допускается выпадение незначительного осадка	1 фл. (12 мл)

Раствор для разведения конъюгата (РРК)	опалесцирующая жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, допускается выпадение незначительного осадка	1 фл. (13 мл)
Цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБР)	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (13 мл)
Хромоген (ТМБ)	раствор тетраметилбензидина; прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (1,3 мл)
Стоп-реагент	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (12,5 мл)
Одноразовые наконечники для автоматических пипеток		16 шт.

Примечания.

1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(х25), ЦБР, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование разных серий этих реагентов или их смешение.

3. Допускается использование ТМБ из разных серий набора.

4. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Принадлежности:

- вспомогательные пластиковые емкости (4 шт.),
- клейкая пленка для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Комплект №3/1 – для подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С путем выявления антител к двум группам антигенов (структурных и неструктурных) при ручной постановке ИФА; рассчитан на проведение 48 анализов, включая контрольные образцы; предусмотрено дробное использование набора.

Комплект набора реагентов позволяют проводить отдельные исследования с использованием необходимого количества стрипов.

Кол-во используемых стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Число исследуемых образцов	2	3-6	7-10	11-14	15-18	19-22	23-26	27-30	31-34	35-38	39-42	43-46

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемых образцах антител к вирусу гепатита С (ВГС), они взаимодействуют с антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок иммуносорбента. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело" связывается с конъюгатом (антитела против иммуноглобулинов человека, конъюгированные с пероксидазой хрена). Комплекс антиген-антитело-конъюгат выявляется в цветной реакции с хромогеном.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Аналитическая специфичность.

Перекрестные иммунологические реакции не наблюдались с образцами биологического материала, содержащими маркеры других заболеваний (гепатиты А, В, Е; ВИЧ, сифилис, мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция).

Интерферирующие вещества (гемоглобин в концентрации до 200 г/л, билирубин в концентрации до 120 мкмоль/л и триглицериды в концентрации 11 ммоль/л) не влияют на результат анализа.

Диагностические характеристики:

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 99,50% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,97% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,40 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,01 % - 100 %

Диагностическая специфичность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,63 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,97 % - 100 %

Диагностическая специфичность на образцах биологического материала доноров (случайная выборка 10 000 образцов) составила: 99,97 % - 100 %

Коэффициент вариации не более 8%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003), в соответствии с требованиями СанПин 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

K+, K-, PPO содержат азид натрия в безопасной концентрации.

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемиче-

ских (профилактических) мероприятий" относится классу Б (эпидемиологически опасные отходы) – инфицированные и потенциально инфицированные отходы, материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка, плазма (с гепарином, цитратом натрия, ЭДТА) крови человека объемом не менее 20 мкл., препараты, приготовленные из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин). Для исследования образцов альбумина, криопреципитата, интерферона исходные растворы вносить согласно инструкции по применению данного набора, лиофильно высушенные препараты крови предварительно восстановить согласно инструкции по их применению. Препараты иммуноглобулинов перед исследованием развести ФСБ-Т в соотношении 1:5. Образцы до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С. При необходимости более длительного хранения образцов сыворотки и плазмы рекомендуется разделить их на аликвоты и хранить при температуре от минус 20 до минус 70 °С. Размороженные образцы перед исследованием нужно тщательно перемешать.

При работе с размороженными образцами следует учитывать, что каждый цикл оттаивания-замораживания приводит к разрушению выявляемых антител, снижая качество исследуемого материала. С целью получения достоверных результатов исследования рекомендуется использовать только однократное замораживание-оттаивание образцов.

Для исключения ложноположительных результатов не рекомендуется анализировать сыворотки с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Достоверность результатов анализа зависит от строгого соблюдения следующих правил:

- Используйте реагенты только данной серии набора (кроме ФСБ-Т(х25), ЦБР, ТМБ, стоп-реагента).
- Не используйте набор с истекшим сроком годности.
- В работе применяйте воду очищенную, соответствующую ФС.2.2.0020.18.
- Не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгата.
- Стеклопосуду тщательно мойте и ополаскивайте водой очищенной или используйте одноразовую посуду.
- Аккуратно разводите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металла. Поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и растворами субстратов.
- Используйте для внесения каждой пробы сменный одноразовый наконечник.
- Никогда не используйте одну и ту же емкость, для приготовления конъюгата и раствора ТМБ.
- Проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы.

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с накопниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин,

Термостат на 37 °С,

Термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий встряхивание при 500 об/мин и поддерживающий температуру 37°С

Холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Анализатор иммуноферментный автоматический.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

2. Приготовление растворов и реагентов для ИФА

Все реагенты до начала анализа должны быть выдержаны не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С. Иммуносорбент выдерживать в упакованном виде, для того чтобы избежать конденсации влаги внутри лунок.

2.1. Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) его необходимо прогреть перед разведением в термостате при 37°С до полного растворения осадка.

ФСБ-Т(х25) развести водой очищенной в 25 раз, используя объемы концентрата и воды очищенной, указанные в табл. 1 для заданного числа стрипов

Таблица 1

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т(х25), мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищ., мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 190 сут, при температуре от 18 до 25 °С – не более 30 суток.

2.2. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовить не менее чем за 10-20 мин до использования.

Конъюгат (концентрат) развести в РРК, используя объемы, указанные в таблице 2 для заданного числа стрипов. Необходимый объем РРК перенести в одноразовую емкость и добавить конъюгат в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 2

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
РРК, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Конъюгат (концентрат), мкл	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК, определяется для каждой серии тест-системы.

Стабильность рабочего раствора конъюгата при температуре от 2 до 8 °С не более 30 сут, при температуре от 18 до 25 °С не более 7 сут. в защищенном от света месте.

2.3. Приготовление раствора хромогена

Готовить перед использованием в месте, защищенном от воздействия прямого солнечного света.

ТМБ развести в ЦБР, используя объемы, указанные в таблице 3 для заданного числа стрипов. Необходимый объем ЦБР перенести в одноразовую емкость и добавить ТМБ в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 3

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ТМБ, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2

Стабильность раствора хромогена при температуре от 18 до 25 °С не более 13 ч. в защищенном от света месте.

Примечание: Посуду и наконечники пипеток, контактировавшие с раствором хромогена, отмывать без применения синтетических моющих средств.

2.4. Приготовление остальных реагентов

РРО перед использованием необходимо тщательно перемешать из-за возможного выпадения осадка. Иммуносорбент, K^+ , K^- , стоп-реагент готовы к использованию.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

3. Проведение ИФА

3.1. Извлечь из пакета, вскрыв выше замка «zip-lock», необходимое для проведения ИФА количество стрипов каждой группы. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник.

Хранение вскрытого иммуносорбента возможно при температуре 2-8°С до истечения срока годности набора.

Рекомендуемая схема постановки ИФА (на 12 стрипах)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Исследуемые образцы											
A	core	K^+	№3	№7	№11	№15	№19	№23	№27	№31	№35	№39	№43
B	NS	K^+	№3	№7	№11	№15	№19	№23	№27	№31	№35	№39	№43
C	core	K^-	№4	№8	№12	№16	№20	№24	№28	№32	№36	№40	№44
D	NS	K^-	№4	№8	№12	№16	№20	№24	№28	№32	№36	№40	№44
E	core	№1	№5	№9	№13	№17	№21	№25	№29	№33	№37	№41	№45
F	NS	№1	№5	№9	№13	№17	№21	№25	№29	№33	№37	№41	№45
G	core	№2	№6	№10	№14	№18	№22	№26	№30	№34	№38	№42	№46
H	NS	№2	№6	№10	№14	№18	№22	№26	№30	№34	№38	№42	№46

3.2. В каждую лунку внести по 80 мкл РРО.

3.3. Все контроли и исследуемые образцы вносят в две лунки вертикального ряда для проведения реакции с каждым антигеном согласно схеме. В лунки, предназначенные для K^+ внести 20 мкл контрольного положительного образца. В лунки, предназначенные для K^- 20 мкл контрольного отрицательного образца. В остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов, затем тщательно перемешать пипетированием (не менее 3 раз) или на шейкере на малой скорости в течение 30 с (100об/мин), цвет РРО при этом должен измениться с сине-фиолетового на зеленый.

3.4. Планшет закрыть крышкой или пленкой и инкубировать в соответствии с выбранной процедурой:

процедура 1 – 30 мин при 37 °С на шейкере (500 об/мин);

процедура 2 – 1 ч при 37 °С в термостате.

3.5. По окончании инкубации аспирировать содержимое лунок и промыть лунки планшета четыре раза, добавляя в каждую лунку не менее 400 мкл рабочего промывочного раствора. Время между заполнением и аспирацией (замачивание) должно быть не менее 30 сек.

Рекомендуется использовать:

- режим отмытки с переполнением – «overflow» - с внесением в лунки по 600-700 мкл рабочего промывочного раствора;

- поперечную аспирацию раствора из лунок – режим «crosswise».

Необходимо следить за полной аспирацией после каждого цикла отмытки (остаточный объем в лунках не должен превышать 10 мкл).

Полностью удалить влагу из лунок, перевернув планшет на сухую чистую фильтровальную бумагу.

Сохранность иммуносорбента между операциями 15 минут.

3.6. Перемешать рабочий раствор конъюгата и внести его по 100 мкл в каждую лунку. Планшет закрыть крышкой и выдержать в течение 30 мин в термостате при температуре 37 °С.

3.7. Стрипы промыть ФСБ-Т 6 раз с использованием обычного промывающего устройства или четыре раза в режиме "overflow" (см. п. 3.5).

3.8. В каждую лунку внести по 100 мкл свежеприготовленного раствора хромогена, выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте (планшет не закрывать) или в термостате при температуре 37 °С в течение 15 мин. (планшет закрыть чистой защитной пленкой).

3.9. В каждую лунку (в той же последовательности, в которой вносился раствор хромогена) внести по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин, но не позднее чем через 10 мин, учесть результаты.

РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при соблюдении следующих условий:

оптическая плотность в лунках с K^+ (ОП_{К+}) – не менее 0,5;

оптическая плотность в лунках с K^- (ОП_{К-}) – не более 0,25.

В противном случае исследование повторить

Для каждой группы антигенов рассчитать критическое значение ОП (ОП_{крит}) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{К-ср} + 0,150;$$

где ОП_{К-ср} – значение ОП в лунках с K^- .

Результаты учитывать по каждой группе антигенов отдельно.

Образец учитывать как отрицательный (не содержащий антител к ВГС), если значение ОП в лунке с ним ниже ОП_{крит} для каждой группы антигенов.

Образец учитывать как положительный (содержащий антитела к ВГС), если значение ОП в лунке с ним выше или равно ОП_{крит} по обоим группам антигенов или только по группе структурных антигенов (core) ВГС.

Образцы с ОП, большей или равной ОП_{крит} только по группе неструктурных антигенов (NS) ВГС, считают неопределенными. Неопределенные образцы должны быть исследованы в других подтверждающих тестах (иммуноблоттинг, ПЦР-анализ) или повторным исследованием сыворотки (плазмы) крови данного пациента в системе "ИФА-ВГС" через 3-6 мес.

Для интерпретации результатов исследования сывороток можно использовать коэффициент позитивности (КП), который рассчитывается для каждого антигена по формуле:

$$КП = \frac{ОП_{иссл.сыв.}}{ОП_{крит.}}$$

Если $КП \geq 1,0$, исследуемый образец расценивать как положительный. Результат анализа считать отрицательным при $КП < 1,0$.

Все положительные образцы должны быть исследованы в подтверждающих ПЦР-тестах.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 2 года. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Транспортирование

Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 15 сут. Замораживание не допускается.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС», соответствует Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности (см. Сведения о нормативной документации).

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ИФА-ВГС», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. 8 (49643) 3-23-11, 3-30-93, тел/факс 8(49643) 3-30-85, 8 (800) 333-33-47.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по науке

С.Г. Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

«14» 01 2021 г.

П.К. Варнавичус

СВОДНАЯ ТАБЛИЦА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ РЕАГЕНТОВ

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т												
ФСБ-Т(х25), мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищ., мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000
Рабочий раствор конъюгата												
РРК, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Конъюгат (концентрат) ¹ , мкл	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Раствор хромогена												
ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ТМБ, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2

¹Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК; указывается для каждой серии тест-системы.

КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА ("ИФА-ВГС", комплект № 3/1)

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в каждую лунку – по 80 мкл РРО; согласно схеме по 20 мкл K ⁺ , K ⁻ и исследуемых образцов
Инкубация	30 мин при 37 °С на шейкере (500 об/мин) или 1 ч при 37 °С, в термостате
Промыть	4 раза ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 100 мкл рабочего разведения конъюгата
Инкубация	30 мин, 37 °С в термостате
Промыть	4 раза в режиме "overflow" или 6 раз ФСБ-Т (обычное промывающее устройство)
Внести	по 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 18-25 °С или в термостате при температуре 37 °С в течение 15 мин
Внести	по 100 мкл стоп-реактанта в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» – по воздуху

ПРОШУТО
В КОЛИЧЕСТВЕ _____ ЛИСТОВ

«14» _____ 2014 год

Ген. Директор
ООО «ВЫИТЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

10 лист 06
Ген. директор ЗАО "ЭКОлаб"
Гашенко Т.Ю.
"14" 07 2014 г.

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"



Т.Ю.Гашенко

2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС»

Комплекты № 1R, 1/1R, 1/2R

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС» предназначен для качественного выявления и подтверждения наличия антител классов IgG и IgM к антигенам вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке (плазме) крови человека, а также препаратах, приготовленных из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин) методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Функциональное назначение: скрининг, подтверждение и диагностика. Применение изделия не имеет популяционных и демографических ограничений.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики in vitro.

Показания и противопоказания к применению изделия

Основные показания к применению: профилактическое обследование доноров, лиц из групп риска, при подготовке к госпитализации, оперативному вмешательству, беременности, диагностика острой фазы гепатита С, диагностика хронического гепатита С.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Вирус гепатита С (ВГС, HCV) — антропоноз; единственный источник (резервуар) возбудителя инфекции — человек, больной острым или хроническим гепатитом. ВГС относится к кровоконтактным инфекциям. Механизмы заражения: естественный (вертикальный — при передаче вируса от матери к ребенку, контактный — при использовании предметов быта и при половых контактах) и искусственный (артифициальный). Искусственный путь заражения может быть реализован посредством гемотрансфузий инфицированной крови или ее препаратов и любых парентеральных манипуляций (медицинского и немедицинского характера), сопровождающихся нарушением целостности кожного покрова и слизистых оболочек.

Вирус гепатита С относится к семейству Flaviviridae, роду Hepacivirus. Геном ВГС представлен однонитевой позитивной цепью РНК, длиной около 9600 нуклеотидных оснований (н.о.). Терминальные части генома ВГС представлены 5' и 3' нетранслируемыми регионами. Вирусная РНК содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин-предшественник размером 3010-3033 аминокислотных остатков, из которого в результате процессинга образуются структурные (core, E1, E2, p7) и неструктурные (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) белки. Структурные белки формируют вирусную частицу. Неструктурные белки участвуют в репликации генома ВГС и процессинге полипротеина-предшественника. Современная классификация включает 7 генотипов (1–7), подразделенных на 88 субтипов (a, b, c

и т.д.), а также 9 межгенотипных рекомбинантных форм. Наибольшее распространение получили всего 6 субтипов ВГС (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a), которые признаны эпидемическими вариантами, обусловившими глобальное распространение инфекции на протяжении XX в. Частота встречаемости каждого из этих субтипов варьирует не только в разных географических зонах, но и в группах риска. Субтипы 1b, 2a и 2b преобладают у пациентов старшего возраста, имеющих в анамнезе переливание крови, хирургические, внутривенные вмешательства или контакты с препаратами крови, тогда как субтипы 1a и 3a ассоциированы с внутривенным введением наркотических средств.

Инфицирование HCV приводит к развитию ОГС, в 50—80% случаев протекающего в безжелтушной форме без клинических проявлений, в результате чего острую фазу (ОГС) заболевания диагностируют редко. Инкубационный период при ОГС колеблется от 2 до 26 нед (в среднем 6—8 нед). Клинические симптомы ОГС не имеют принципиальных отличий от таковых при других парентеральных гепатитах. Длительность преджелтушного периода составляет от нескольких дней до 2 нед; он может отсутствовать у 20% больных. ОГС протекает преимущественно в среднетяжелой форме, у 30% больных — в легкой. Возможно тяжелое течение болезни (редко), а фульминантный ОГС, приводящий к летальному исходу. При естественном течении 20-50% больных ОГС спонтанно выздоравливают, у остальных происходит развитие ХГС.

Для диагностики гепатита С доступны как серологические, так и молекулярно-генетические методы исследования. Для диагностики ОГС можно прибегнуть к выявлению вирусной РНК методом ПЦР, так как ее можно обнаружить уже в первые 1—2 нед заболевания, в то время как антитела появляются только через несколько недель. Использование тест-систем III поколения, значительно более чувствительных и специфичных, позволяет выявить анти-HCV в сыворотке крови уже через 7—10 дней от начала желтухи. Анти-HCV можно обнаружить как при ОГС, так и при ХГС. При этом анти-HCV IgM одинаково часто обнаруживают у больных как острым, так и хроническим гепатитом С. Кроме того, анти-HCV могут изолированно циркулировать в крови пациентов, которые выздоровели после ОГС или находятся в фазе ремиссии после элиминации РНК HCV в результате противовирусной терапии. Особенную диагностическую ценность для установления диагноза ОГС имеет обнаружение анти-ВГС в динамике болезни при отрицательном результате исследования в ранние сроки болезни. Современные тест-системы позволяют повысить выявляемость анти-HCV у 98—100% иммунокомпетентных инфицированных лиц.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	полипептиды, аналоги антигенов вируса гепатита С (ВГС), соответствующие участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS3, NS4, NS5) областями генома ВГС, сорбированные в лунках стрипов полистироловых планшетов с плоским дном для ИФА	компл. № 1R	компл. № 1/1R	компл. № 1/2R
		2 планшета (24 стрипа)	1 планшет (12 стрипов)	5 планшетов (60 стрипов)
	допускается раздельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)			
Контрольный положительный образец (K ⁺)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость малинового цвета	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (0,5 мл)	1 фл. (3,0 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость синего цвета.	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (4,0 мл)
Конъюгат	антитела диагностические против IgG и IgM человека с пероксидазой хрена; прозрачная	2 фл. (по 14,0 мл)	1 фл. (по 12,0 мл)	5 фл. (по 14,0 мл)

	жидкость красного цвета			
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная, пенящаяся жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин.	2 фл. (по 40 мл)	1 фл. (40 мл)	2 фл. (по 100 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	опалесцирующая жидкость сине-фиолетового цвета, допускается выпадение незначительного осадка	2 фл. (по 14 мл)	1 фл. (12 мл)	5 фл. (по 14 мл)
Цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБР)	прозрачная, бесцветная жидкость	2 фл. (по 14 мл)	1 фл. (13 мл)	5 фл. (по 14 мл)
Хромоген (ТМБ)	раствор тетраметилбензидина; прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (1,3 мл)	1 фл. (7,5 мл)
Стоп-реагент	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (25 мл)	1 фл. (12,5 мл)	1 фл. (70 мл)
Одноразовые наконечники для автоматических пипеток		16 шт		32 шт

Примечания.

1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(x25), ЦБР, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование разных серий этих реагентов или их смешение.

3. Допускается использование ТМБ из разных серий набора.

4. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Принадлежности:

- вспомогательные пластиковые емкости: Комплекты №1R, №1/1R - 4 шт., Комплект №1/2R – 8 шт.

- клейкая пленка для планшетов: Комплекты №1R, №1/1R - 4 шт., Комплект №1/2R – 8 шт.

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Комплект № 1R - для выявления антител к вирусу гепатита С в скрининговом исследовании при ручной постановке ИФА или с использованием ИФА-анализатора открытого типа; рассчитан на проведение 192 анализов, включая контрольные образцы; предусмотрено дробное использование набора. Максимально возможны 24 независимые постановки по 8 анализов при ручной постановке или 2 постановки по 96 анализов с использованием ИФА-анализатора открытого типа.

Комплект № 1/1R - для выявления антител к вирусу гепатита С в скрининговом исследовании при ручной постановке ИФА; рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные образцы; предусмотрено дробное использование набора. Максимально возможны 12 независимых постановок по 8 анализов при ручной постановке или 1 постановка - 96 анализов с использованием ИФА-анализатора открытого типа.

Комплект № 1/2R - для выявления антител к вирусу гепатита С в скрининговом исследовании при ручной постановке ИФА или с использованием ИФА-анализатора открытого типа, рассчитан на проведение 480 анализов, включая контрольные образцы; предусмотрено дробное использование набора. Возможны 60 независимых постановок по 8 анализов при ручной постановке или 5 постановок по 96 анализов с использованием ИФА-анализаторов открытого типа.

Все комплекты набора реагентов позволяют проводить отдельные исследования с использованием необходимого количества стрипов.

Рекомендуется следующая схема внесения контрольных и исследуемых образцов:

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Кол-во контрольных образцов	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Кол-во исследуемых образцов	1-6	7-14	15-22	23-29	30-37	38-45	46-53	54-61	62-69	70-77	78-85	86-93

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемых образцах антител к вирусу гепатита С (ВГС), они взаимодействуют с антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок иммуносорбента. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело" связывается с конъюгатом (антитела против иммуноглобулинов человека, конъюгированные с пероксидазой хрена). Комплекс антиген-антитело-конъюгат выявляется в цветной реакции с хромогеном.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Аналитическая специфичность.

Перекрестные иммунологические реакции не наблюдались с образцами биологического материала, содержащими маркеры других заболеваний (гепатиты А, В, Е; ВИЧ, сифилис, мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция).

Интерферирующие вещества (гемоглобин в концентрации до 200 г/л, билирубин в концентрации до 120 мкмоль/л и триглицериды в концентрации 11 ммоль/л) не влияют на результат анализа.

Диагностические характеристики:

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 99,50% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,97% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,40 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,01 % - 100 %
Диагностическая специфичность для каждого вида биологического материала составила:
Сыворотка крови человека: 99,63 % - 100 %
Плазма крови человека: 99,97 % - 100 %

Диагностическая специфичность на образцах биологического материала доноров (случайная выборка 10 000 образцов) составила: 99,97 % - 100 %

Коэффициент вариации не более 8%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003), в соответствии с требованиями СанПин 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

К+, К-, РРО содержат азид натрия в безопасной концентрации.

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" относится к классу Б (эпидемиологически опасные отходы) – инфицированные и потенциально инфицированные отходы, материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка, плазма (с гепарином, цитратом натрия, ЭДТА) крови человека объемом не менее 20 мкл, препараты, приготовленные из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин). Для исследования образцов альбумина, криопреципитата, интерферона исходные растворы вносить согласно инструкции по применению данного набора, лиофильно высушенные препараты крови предварительно восстановить согласно инструкции по их применению. Препараты иммуноглобулинов перед исследованием развести ФСБ-Т в соотношении 1:5.

Образцы до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С. При необходимости более длительного хранения образцов сыворотки и плазмы рекомендуется

разделить их на аликвоты и хранить при температуре от минус 20 до минус 70 °С. Размороженные образцы перед исследованием нужно тщательно перемешать.

При работе с размороженными образцами следует учитывать, что каждый цикл оттаивания-замораживания приводит к разрушению выявляемых антител, снижая качество исследуемого материала. С целью получения достоверных результатов исследования рекомендуется использовать только однократное замораживание-оттаивание образцов.

Для исключения ложноположительных результатов не рекомендуется анализировать сыворотки с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Достоверность результатов анализа зависит от строгого соблюдения следующих правил:

- Используйте реагенты только данной серии набора (кроме ФСБ-Т(х25), ЦБР, стоп-реагента).
- Не используйте набор с истекшим сроком годности.
- В работе применяйте воду очищенную, соответствующую ФС.2.2.0020.18.
- Не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгата.
- Стекланную посуду тщательно мойте и ополаскивайте водой очищенной или используйте одноразовую посуду.
- Аккуратно разводите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металла. Поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и растворами субстратов.
- Используйте для внесения каждой пробы сменный одноразовый наконечник.
- Проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы.

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин,

Термостат на 37 °С,

Термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий встряхивание при 500 об/мин и поддерживающий температуру 37°С

Холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Анализатор иммуноферментный автоматический.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С. Иммуносорбент выдерживать в упакованном виде, для того чтобы избежать конденсации влаги внутри лунок.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

При использовании одного планшета 40 мл ФСБ-Т(х25) довести водой очищенной до 1 л.

При дробной постановке использовать соотношения объемов ФСБ-Т(х25) и воды, указанные в таблице 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т(х25), мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищенная, мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 190 сут, при температуре от 18 до 25 °С – не более 30 суток.

Приготовление раствора хромогена (ТМБ)

Готовить перед использованием в месте, защищенном от воздействия прямого солнечного света.

ТМБ развести в ЦБР, используя объемы ТМБ и ЦБР, указанные в табл. 2 для заданного числа стрипов. Необходимый объем ЦБР перенести в одноразовую емкость и добавить ТМБ в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 2

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ТМБ, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,1	1,2

Стабильность раствора хромогена при температуре от 18 до 25 °С не более 13 ч. в защищенном от света месте.

Примечание: Посуду и наконечники пипеток, контактировавшие с раствором хромогена, отмывать без применения синтетических моющих средств.

Приготовление остальных реагентов

РРО перед использованием необходимо тщательно перемешать из-за возможного выпадения осадка; иммуносорбент, K^+ , K^- , конъюгат, стоп-реагент готовы к использованию.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты хранить в плотно закрытой упаковке при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Проведение ИФА

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из пакета планшет, вскрыв выше замка «zip-lock», и установить на рамку необходимое для проведения ИФА количество стрипов. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник.

Хранение вскрытого иммуносорбента возможно при температуре 2-8°С до истечения срока годности набора.

2. В каждую лунку вносят по 80 мкл РРО.

3. В лунки A1, B1 вносят по 20 мкл K^+ , в лунки C1, D1, E1 – по 20 мкл K^- , в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов, затем тщательно перемешать пипетированием (не менее 3 раз) или на шейкере на малой скорости (100 об/мин) в течение 30 секунд, цвет РРО при этом должен измениться с сине-фиолетового на зеленый.

4. Планшет закрывают крышкой или клейкой пленкой.

Инкубируют согласно выбранной процедуре:

Процедура №1 - 30 мин при 37°C на шейкере (500 об/мин), либо

Процедура №2 - 1 ч при 37 °C в термостате.

5. По окончании инкубации аспирируют содержимое лунок и промывают лунки планшета 4 раза промывочным раствором, добавляя в каждую лунку не менее 400 мкл жидкости. Время между заполнением и аспирацией (замачивание) должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки удалить влагу из лунок, постукивая планшетом по фильтрованной бумаге.

Рекомендуется использовать:

- режим отмывки с переполнением – «overflow» - с внесением в лунки по 600-700 мкл рабочего промывочного раствора;

- поперечную аспирацию раствора из лунок – режим «crosswise».

Необходимо следить за полной аспирацией после каждого цикла отмывки (остаточный объем в лунках не должен превышать 10 мкл). Сохранность иммуносорбента между операциями 15 минут.

6. Во все лунки внести по 100 мкл раствора конъюгата. Планшет закрывают крышкой или пленкой и выдерживают при температуре 37 °C 30 мин в термостате.

7. Планшет промывают ФСБ-Т 6 раз с использованием обычного промывающего устройства или 4 раза в режиме "overflow" (см. п. 5).

8. В каждую лунку внести по 100 мкл свежеприготовленного раствора хромогена, выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °C в защищенном от света месте (планшет не закрывать) или в термостате при температуре 37 °C в течение 15 мин. (планшет закрыть чистой защитной пленкой).

9. В каждую лунку (в той же последовательности, в которой вносился раствор хромогена) внести по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты, но не позднее, чем через 40 минут учесть результаты реакции.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при соблюдении следующих условий:

оптическая плотность в лунках с K^+ ($ОП_{K^+}$) - не менее 1,0;

оптическая плотность в лунках с K^- ($ОП_{K^-}$) - не более 0,25.

В противном случае исследование повторить.

Рассчитать критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{K-ср} + 0,200;$$

где $ОП_{K-ср}$ – среднее значение ОП в лунках с K^- .

Если одно из значений $ОП_{K^-}$ отличается от $ОП_{K-ср}$ более, чем на 30 %, то его не учитывать, а для вычисления $ОП_{K-ср}$ использовать два оставшиеся значения). Если за эти пределы выходят два значения $ОП_{K^-}$, исследование необходимо повторить.

Образец сыворотки учитывать как отрицательный, если значение ОП в лунке с ним меньше $ОП_{крит}$.

Если значение ОП в лунке с образцом выше или равно $ОП_{крит}$, образец должен быть исследован повторно в данном тесте не менее чем в двух лунках. Если в повторном исследовании хотя бы в одной лунке $ОП_{обр}$ больше или равно $ОП_{крит}$, образец считается положительным. Если в повторном исследовании в обеих лунках $ОП_{обр}$ меньше $ОП_{крит}$, образец учитывается как отрицательный.

Для интерпретации результатов исследования сывороток можно использовать коэффициент позитивности (КП), который рассчитывается по формуле:

$$КП = \frac{ОП_{иссл.сыв.}}{ОП_{крит.}}$$

Если $КП \geq 1,0$, исследуемый образец расценивать как положительный. Результат анализа считать отрицательным при $КП < 1,0$.

Все положительные образцы должны быть исследованы в подтверждающих ИФА-тестах или в иммуноблоттинге и в ПЦР-тестах.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ. Приготовить ФСБ-Т, рабочий раствор конъюгата и раствор хромогена, используя реагенты и их соотношения, указанные в таблице 3 для проведения исследования на одном планшете.

Таблица 3

ФСБ-Т		Раствор хромогена	
ФСБ-Т(х25), мл	Вода очищенная, мл	ТМБ, мл	ЦБР, мл
40	до 1000	1,4	14

Спектрофотометрический контроль стадий ИФА при постановке на автоматических анализаторах.

Контроль внесения исследуемых образцов и конъюгата проводить при длине волны 450 нм. При этом ОП>0,1.

Контроль внесения рабочего раствора хромогена проводить при длине волны 450 нм. При этом ОП>0,08.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Транспортирование

Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 15 сут. Замораживание не допускается.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС», соответствует Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности (см. Сведения о нормативной документации).

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ИФА-ВГС», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. 8 (49643) 3-23-11, 3-30-93, тел/факс 8(49643) 3-30-85, 8 (800) 333-33-47.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по науке



С.Г. Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

« 14 » 01 2021 г.



П.К. Варнавичус

СВОДНАЯ ТАБЛИЦА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ РЕАГЕНТОВ

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т												
ФСБ-Т(х25), мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищ., мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000
Раствор хромогена												
ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ТМБ, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2

КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

«ИФА-ВГС»

Комплекты № 1R, 1/1R, 1/2R

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в каждую лунку – по 80 мкл РРО; по 20мкл контрольных образцов, в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов
Инкубация	Процедура 1 30 мин при 37 °С на шейкере (500 об/мин) или Процедура 2 1 ч при 37 °С, в термостате
Промыть	4 раза ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 100 мкл раствора конъюгата
Инкубация	30 мин, 37 °С в термостате
Промыть	4 раза в режиме "overflow" или 6 раз ФСБ-Т (обычное промывающее устройство)
Внести	по 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 18-25 °С или в термостате при температуре 37 °С в течение 15 мин
Внести	по 100 мкл стоп-реактанта в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), "бланк" - по воздуху

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 11 ЛИСТОВ

«14» 01 2022 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

лист св
Ген. директор ЗАО "ЭКОлаб"
Гашенко Т.Ю.
«14» 01 2022 г.



"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"



Т.Ю.Гашенко
2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к
вирусу гепатита С»
«ИФА-ВГС»

Комплекты № 1, 1/1, 1/1а, 1/2

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС» предназначен для качественного выявления и подтверждения наличия антител классов IgG и IgM к антигенам вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке (плазме) крови человека, а также препаратах, приготовленных из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин) методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Функциональное назначение: скрининг, подтверждение и диагностика. Применение изделия не имеет популяционных и демографических ограничений.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики in vitro.

Показания и противопоказания к применению изделия

Основные показания к применению: профилактическое обследование доноров, лиц из групп риска, при подготовке к госпитализации, оперативному вмешательству, беременности, диагностика острой фазы гепатита С, диагностика хронического гепатита С.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Вирус гепатита С (ВГС, HCV) — антропоноз; единственный источник (резервуар) возбудителя инфекции — человек, больной острым или хроническим гепатитом. ВГС относится к кровоконтактным инфекциям. Механизмы заражения: естественный (вертикальный — при передаче вируса от матери к ребенку, контактный — при использовании предметов быта и при половых контактах) и искусственный (артифициальный). Искусственный путь заражения может быть реализован посредством гемотрансфузий инфицированной крови или ее препаратов и любых парентеральных манипуляций (медицинского и немедицинского характера), сопровождающихся нарушением целостности кожного покрова и слизистых оболочек.

Вирус гепатита С относится к семейству Flaviviridae, роду Hepacivirus. Геном ВГС представлен однонитевой позитивной цепью РНК, длиной около 9600 нуклеотидных оснований (н.о.). Терминальные части генома ВГС представлены 5' и 3' нетранслируемыми регионами. Вирусная РНК содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин-предшественник размером 3010-3033 аминокислотных остатков, из которого в результате процессинга образуются структурные (core, E1, E2, p7) и неструктурные (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) белки. Структурные белки формируют вирусную частицу. Неструктурные белки участвуют в репликации генома ВГС и процессинге полипротеина-предшественника. Современная классификация включает 7 генотипов (1–7), подразделенных на 88 субтипов (a, b, c и т.д.), а также 9 межгенотипных рекомбинантных форм. Наибольшее распространение получили всего 6 субтипов ВГС (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a), которые признаны эпидемическими вариантами,

обусловившими глобальное распространение инфекции на протяжении XX в. Частота встречаемости каждого из этих субтипов варьирует не только в разных географических зонах, но и в группах риска. Субтипы 1b, 2a и 2b преобладают у пациентов старшего возраста, имеющих в анамнезе переливание крови, хирургические, внутривенные вмешательства или контакты с препаратами крови, тогда как субтипы 1a и 3a ассоциированы с внутривенным введением наркотических средств.

Инфицирование HCV приводит к развитию ОГС, в 50—80% случаев протекающего в безжелтушной форме без клинических проявлений, в результате чего острую фазу (ОГС) заболевания диагностируют редко. Инкубационный период при ОГС колеблется от 2 до 26 нед (в среднем 6—8 нед). Клинические симптомы ОГС не имеют принципиальных отличий от таковых при других парентеральных гепатитах. Длительность преджелтушного периода составляет от нескольких дней до 2 нед; он может отсутствовать у 20% больных. ОГС протекает преимущественно в среднетяжелой форме, у 30% больных — в легкой. Возможно тяжелое течение болезни (редко), а фульминантный ОГС, приводящий к летальному исходу. При естественном течении 20-50% больных ОГС спонтанно выздоравливают, у остальных происходит развитие ХГС.

Для диагностики гепатита С доступны как серологические, так и молекулярно-генетические методы исследования. Для диагностики ОГС можно прибегнуть к выявлению вирусной РНК методом ПЦР, так как ее можно обнаружить уже в первые 1—2 нед заболевания, в то время как антитела появляются только через несколько недель. Использование тест-систем III поколения, значительно более чувствительных и специфичных, позволяет выявить анти-HCV в сыворотке крови уже через 7—10 дней от начала желтухи. Анти-HCV можно обнаружить как при ОГС, так и при ХГС. При этом анти-HCV IgM одинаково часто обнаруживают у больных как острым, так и хроническим гепатитом С. Кроме того, анти-HCV могут изолированно циркулировать в крови пациентов, которые выздоровели после ОГС или находятся в фазе ремиссии после элиминации РНК HCV в результате противовирусной терапии. Особенную диагностическую ценность для установления диагноза ОГС имеет обнаружение анти-ВГС в динамике болезни при отрицательном результате исследования в ранние сроки болезни. Современные тест-системы позволяют повысить выявляемость анти-HCV у 98—100% иммунокомпетентных инфицированных лиц.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	полипептиды, аналоги антигенов вируса гепатита С (ВГС), соответствующие участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS3, NS4, NS5) областями генома ВГС, сорбированные в лунках стрипов полистироловых планшетов с плоским дном для ИФА	компл. № 1	компл. № 1/1	компл. № 1/1a	компл. № 1/2
		2 планшета (24 стрипа)	1 планшет (12 стрипов)	1 планшет (12 стрипов)	5 планшетов (60 стрипов)
	допускается раздельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)				
Контрольный положительный образец (K ⁺)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость малинового цвета	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (0,5 мл)	1 фл. (0,5 мл)	1 фл. (3,0 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость синего цвета.	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (4,0 мл)
Конъюгат (концентрат)	антитела диагностические против IgG и IgM человека с пероксидазой хрена; прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (2,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (2,0 мл)	1 фл. (5,0 мл)
25-кратный	прозрачная или слегка	2 фл.	1 фл.	1 фл.	2 фл.

концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(х25)]	опалесцирующая, бесцветная, пенящаяся жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин.	(по 40 мл)	(40 мл)	(40 мл)	(по 100 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	опалесцирующая жидкость синевioletового цвета, допускается выпадение незначительного осадка	2 фл. (по 14 мл)	1 фл. (12 мл)	1 фл. (15 мл)	5 фл. (по 14 мл)
Раствор для разведения конъюгата (РРК)	опалесцирующая жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, допускается выпадение незначительного осадка	2 фл. (по 14 мл)	1 фл. (13 мл)	1 фл. (25 мл)	5 фл. (по 14 мл)
Цитратный буферный раствор перекисью водорода (ЦБР)	прозрачная, бесцветная жидкость	2 фл. (по 14 мл)	1 фл. (13 мл)	1 фл. (25 мл)	5 фл. (по 14 мл)
Хромоген (ТМБ)	раствор тетраметилбензидина; прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (1,3 мл)	1 фл. (2,5 мл)	1 фл. (7,5 мл)
Стоп-реагент	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (25 мл)	1 фл. (12,5 мл)	1 фл. (25 мл)	1 фл. (70 мл)
Одноразовые наконечники для автоматических пипеток		16 шт.			32 шт.

Примечания.

1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(х25), ЦБР, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование разных серий этих реагентов или их смешение.

3. Допускается использование ТМБ из разных серий набора.

4. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

- вспомогательные пластиковые емкости: Комплекты №1, №1/1, №1/1а - 4 шт., Комплект №1/2 – 8 шт.

- клейкая пленка для планшетов: Комплекты №1, №1/1, №1/1а - 4 шт., Комплект №1/2 – 8 шт.

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Комплект № 1 - для выявления антител к вирусу гепатита С в скрининговом исследовании при ручной постановке ИФА или с использованием ИФА-анализатора открытого типа; рассчитан на проведение 192 анализов, включая контрольные образцы; предусмотрено

дробное использование набора. Максимально возможны 24 независимые постановки по 8 анализов при ручной постановке или 2 постановки по 96 анализов с использованием ИФА-анализатора открытого типа.

Комплект № 1/1 -для выявления антител к вирусу гепатита С в скрининговом исследовании при ручной постановке ИФА; рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные образцы; предусмотрено дробное использование набора. Максимально возможны 12 независимых постановок по 8 анализов при ручной постановке или 1 постановка - 96 анализов с использованием ИФА-анализатора открытого типа.

Комплект № 1/1a -для выявления антител к вирусу гепатита С в скрининговом исследовании при ручной постановке ИФА или с использованием ИФА-анализатора открытого типа; рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные образцы; предусмотрено дробное использование набора. Максимально возможны 12 независимых постановок по 8 анализов при ручной постановке или 3 независимых постановки по 32 анализа (4 стрипа) с использованием ИФА-анализатора открытого типа.

Комплект № 1/2 – для выявления антител к вирусу гепатита С в скрининговом исследовании при ручной постановке ИФА или с использованием ИФА-анализатора открытого типа, рассчитан на проведение 480 анализов, включая контрольные образцы; предусмотрено дробное использование набора. Возможны 60 независимых постановок по 8 анализов при ручной постановке или 5 постановок по 96 анализов с использованием ИФА-анализаторов открытого типа.

Все комплекты набора реагентов позволяют проводить отдельные исследования с использованием необходимого количества стрипов.

Рекомендуется следующая схема внесения контрольных и исследуемых образцов:

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Кол-во контрольных образцов	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Кол-во иссл. образцов	1-6	7-14	15-22	23-29	30-37	38-45	46-53	54-61	62-69	70-77	78-85	86-93

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемых образцах антител к вирусу гепатита С (ВГС), они взаимодействуют с антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок иммуносорбента. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело" связывается с конъюгатом (антитела против иммуноглобулинов человека, конъюгированные с пероксидазой хрена). Комплекс антиген-антитело-конъюгат выявляется в цветной реакции с хромогеном.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Коэффициент вариации не более 8%.

Аналитическая специфичность.

Перекрестные иммунологические реакции не наблюдались с образцами биологического материала, содержащими маркеры других заболеваний (гепатиты А, В, Е; ВИЧ, сифилис, мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция).

Интерферирующие вещества (гемоглобин в концентрации до 200 г/л, билирубин в концентрации до 120 мкмоль/л и триглицериды в концентрации 11 ммоль/л) не влияют на результат анализа.

Диагностические характеристики:

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 99,50% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,97% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,40 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,01 % - 100 %

Диагностическая специфичность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,63 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,97 % - 100 %

Диагностическая специфичность на образцах биологического материала доноров (случайная выборка 10 000 образцов) составила: 99,97 % - 100 %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинично-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003), в соответствии с требованиями СанПин 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

К+, К-, РРО содержат азид натрия в безопасной концентрации.

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" относится к классу Б (эпидемиологически опасные отходы) – инфицированные и потенциально инфицированные отходы, материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка, плазма (с гепарином, цитратом натрия, ЭДТА) крови человека объемом не менее 20 мкл., препараты, приготовленные из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин). Для исследования образцов альбумина, криопреципитата, интерферона исходные растворы вносить согласно инструкции по применению данного набора, лиофильно высушенные препараты крови предварительно восстановить согласно инструкции по их применению. Препараты иммуноглобулинов перед исследованием развести ФСБ-Т в соотношении 1:5.

Образцы до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С. При необходимости более длительного хранения образцов сыворотки и плазмы рекомендуется разделить их на аликвоты и хранить при температуре от минус 20 до минус 70 °С. Размороженные образцы перед исследованием нужно тщательно перемешать.

При работе с размороженными образцами следует учитывать, что каждый цикл оттаивания-замораживания приводит к разрушению выявляемых антител, снижая качество исследуемого материала. С целью получения достоверных результатов исследования рекомендуется использовать только однократное замораживание-оттаивание образцов.

Для исключения ложноположительных результатов не рекомендуется анализировать сыворотки с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Достоверность результатов анализа зависит от строгого соблюдения следующих правил:

- Используйте реагенты только данной серии набора (кроме ФСБ-Т(х25), ЦБР, ТМБ, стоп-реагента).
- Не используйте набор с истекшим сроком годности.
- В работе применяйте воду очищенную, соответствующую ФС.2.2.0020.18.
- Не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгата.
- Стеклянную посуду тщательно мойте и ополаскивайте водой очищенной или используйте одноразовую посуду.
- Аккуратно разводите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металла. Поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и растворами субстратов.
- Используйте для внесения каждой пробы сменный одноразовый наконечник.
- Никогда не используйте одну и ту же емкость, для приготовления конъюгата и раствора ТМБ.
- Проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы.

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин,
Термостат на 37 °С,

Термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий встряхивание при 500 об/мин и поддерживающий температуру 37°C

Холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Анализатор иммуноферментный автоматический.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С. Иммуносорбент выдерживать в упакованном виде, для того чтобы избежать конденсации влаги внутри лунок.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

При использовании одного планшета 40 мл ФСБ-Т(х25) довести водой очищенной до 1 л.

При дробной постановке использовать соотношения объемов ФСБ-Т(х25) и воды, указанные в таблице 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т(х25), мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищенная, мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 190 сут, при температуре от 18 до 25 °С – не более 30 суток.

Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовить не менее чем за 10-20 мин до использования.

Конъюгат (концентрат) развести в РРК, используя объемы конъюгата и РРК, указанные в табл. 2 для заданного числа стрипов. Необходимый объем РРК перенести в одноразовую емкость и добавить конъюгат в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 2

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
РРК, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Конъюгат (концентрат), мкл		...	...		...	...		...		...		...

Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК, определяется для каждой серии тест-системы.

Стабильность рабочего раствора конъюгата при температуре от 2 до 8 °С не более 30 сут, при температуре от 18 до 25 °С не более 7 сут. в защищенном от света месте.

Приготовление раствора хромогена (ТМБ)

Готовить перед использованием в месте, защищенном от воздействия прямого солнечного света.

ТМБ развести в ЦБР, используя объемы ТМБ и ЦБР, указанные в табл. 3 для заданного числа стрипов. Необходимый объем ЦБР перенести в одноразовую емкость и добавить ТМБ в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 3

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ТМБ, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,1	1,2

Стабильность раствора хромогена при температуре от 18 до 25 °С не более 13 ч. в защищенном от света месте.

Примечание: Посуду и наконечники пипеток, контактировавшие с раствором хромогена, отмывать без применения синтетических моющих средств.

Приготовление остальных реагентов

PPO перед использованием необходимо тщательно перемешать из-за возможного выпадения осадка; иммуносорбент, K^+ , K^- , стоп-реагент готовы к использованию.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты хранить в плотно закрытой упаковке при температуре от 2 до 8 °C до истечения срока годности.

Проведение ИФА

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из пакета планшет, вскрыв выше замка «zip-lock», и установить на рамку необходимое для проведения ИФА количество стрипов. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник.

Хранение вскрытого иммуносорбента возможно при температуре 2-8°C до истечения срока годности набора.

2. В каждую лунку вносят по 80 мкл PPO.

3. В лунки A1, B1 вносят по 20 мкл K^+ , в лунки C1, D1, E1 – по 20 мкл K^- , в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов, затем тщательно перемешать пипетированием (не менее 3 раз) или на шейкере на малой скорости (100 об/мин) в течение 30 секунд, цвет PPO при этом должен измениться с сине-фиолетового на зеленый.

4. Планшет закрывают крышкой или клейкой пленкой.

Инкубируют согласно выбранной процедуре:

Процедура №1 - 30 мин при 37°C на шейкере (500 об/мин), либо

Процедура №2 - 1 ч при 37 °C в термостате.

5. По окончании инкубации аспирируют содержимое лунок и промывают лунки планшета 4 раза промывочным раствором, добавляя в каждую лунку не менее 400 мкл жидкости. Время между заполнением и аспирацией (замачивание) должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки удалить влагу из лунок, постукивая планшетом по фильтрованной бумаге.

Рекомендуется использовать:

- режим отмытки с переполнением – «overflow» - с внесением в лунки по 600-700 мкл рабочего промывочного раствора;

- поперечную аспирацию раствора из лунок – режим «crosswise».

Необходимо следить за полной аспирацией после каждого цикла отмытки (остаточный объем в лунках не должен превышать 10 мкл). Сохранность иммуносорбента между операциями 15 минут.

6. Перемешивают рабочий раствор конъюгата и вносят его по 100 мкл в каждую лунку. Планшет закрывают крышкой или пленкой и выдерживают при температуре 37 °C 30 мин в термостате.

7. Планшет промывают ФСБ-Т 6 раз с использованием обычного промывающего устройства или 4 раза в режиме "overflow" (см. п. 5).

8. В каждую лунку внести по 100 мкл свежеприготовленного раствора хромогена, выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °C в защищенном от света месте (планшет не закрывать) или в термостате при температуре 37 °C в течение 15 мин. (планшет закрыть чистой защитной пленкой).

9. В каждую лунку (в той же последовательности, в которой вносился раствор хромогена) внести по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты, но не позднее, чем через 40 минут учесть результаты реакции.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при соблюдении следующих условий:

оптическая плотность в лунках с K^+ ($ОП_{K^+}$) - не менее 1,0;
оптическая плотность в лунках с K^- ($ОП_{K^-}$) - не более 0,25.

В противном случае исследование повторить.

Рассчитать критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{K-ср} + 0,200;$$

где $ОП_{K-ср}$ – среднее значение ОП в лунках с K^- .

Если одно из значений $ОП_{K^-}$ отличается от $ОП_{K-ср}$ более, чем на 30 %, то его не учитывать, а для вычисления $ОП_{K-ср}$ использовать два оставшиеся значения). Если за эти пределы выходят два значения $ОП_{K^-}$, исследование необходимо повторить.

Образец сыворотки учитывать как отрицательный, если значение ОП в лунке с ним меньше $ОП_{крит}$.

Если значение ОП в лунке с образцом выше или равно $ОП_{крит}$, образец должен быть исследован повторно в данном тесте не менее чем в двух лунках. Если в повторном исследовании хотя бы в одной лунке $ОП_{обр}$ больше или равно $ОП_{крит}$, образец считается положительным. Если в повторном исследовании в обеих лунках $ОП_{обр}$ меньше $ОП_{крит}$, образец учитывается как отрицательный.

Для интерпретации результатов исследования сывороток можно использовать коэффициент позитивности (КП), который рассчитывается по формуле:

$$КП = \frac{ОП_{иссл.сыв.}}{ОП_{крит.}}$$

Если $КП \geq 1,0$, исследуемый образец расценивать как положительный. Результат анализа считать отрицательным при $КП < 1,0$.

Все положительные образцы должны быть исследованы в подтверждающих ИФА-тестах или в иммуноблоттинге и в ПЦР-тестах.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

Приготовить ФСБ-Т, рабочий раствор конъюгата и раствор хромогена, используя реагенты и их соотношения, указанные в таблице 4 для проведения исследования на одном планшете.

Таблица 4

ФСБ-Т		Рабочий раствор конъюгата		Раствор хромогена	
ФСБ-Т(х25), мл	Вода очищенная, мл	Конъюгат (концентрат) ¹ , мкл	РРК, мл	ТМБ, мл	ЦБР, мл
40	до 1000		14	1,4	14

¹Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК, определяется для каждой серии тест-системы.

Спектрофотометрический контроль стадий ИФА при постановке на автоматических анализаторах.

Контроль внесения исследуемых образцов и рабочего раствора конъюгата проводить при длине волны 450 нм. При этом $ОП > 0,1$.

Контроль внесения рабочего раствора хромогена проводить при длине волны 450 нм. При этом $ОП > 0,08$.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 2 года. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Транспортирование

Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 15 сут. Замораживание не допускается.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС», соответствует Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности (см. Сведения о нормативной документации).

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ИФА-ВГС», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. 8 (49643) 3-23-11, 3-30-93, тел/факс 8(49643) 3-30-85, 8 (800) 333-33-47.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по науке

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

«14» 01 2021 г.



С.Г.Марданлы

П.К. Варнавичус

СВОДНАЯ ТАБЛИЦА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ РЕАГЕНТОВ

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т												
ФСБ-Т(х25), мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищ., мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000
Рабочий раствор конъюгата												
РРК, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Конъюгат (концентрат) ¹ , мкл	...	...					...		...	...	...	...
Раствор хромогена												
ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ТМБ, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,1	1,2

¹Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК, определяется для каждой серии тест-системы.

КРАТКАЯ СХЕМА ИФА «ИФА-ВГС» Комплекты № 1, 1/1, 1/1a, 1/2

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в каждую лунку – по 80 мкл РРО; по 20мкл контрольных образцов, в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов
Инкубация	Процедура 1 30 мин при 37 °С на шейкере (500 об/мин) или Процедура 2 1 ч при 37 °С, в термостате
Промыть	4 раза ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 100 мкл рабочего разведения конъюгата
Инкубация	30 мин, 37 °С в термостате
Промыть	4 раза в режиме "overflow" или 6 раз ФСБ-Т (обычное промывающее устройство)
Внести	по 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 18-25 °С или в термостате при температуре 37 °С в течение 15 мин
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), "бланк" - по воздуху

ПРОШУТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 11 ЛИСТОВ

« 21 » 2022 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус Н.К.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

11 лист 06

Ген. директор ЗАО "ЭКОлаб"
Гашенко Т.Ю.
" 11 " 2022 г.

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"



Т.Ю.Гашенко
2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия
антител к вирусу гепатита С»
«ИФА-ВГС»

Комплект № 2

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС» предназначен для качественного выявления и подтверждения наличия антител классов IgG и IgM к антигенам вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке (плазме) крови человека, а также препаратах, приготовленных из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин) методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Функциональное назначение: скрининг, подтверждение и диагностика. Применение изделия не имеет популяционных и демографических ограничений.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики in vitro.

Показания и противопоказания к применению изделия

Основные показания к применению: профилактическое обследование доноров, лиц из групп риска, при подготовке к госпитализации, оперативному вмешательству, беременности, диагностика острой фазы гепатита С, диагностика хронического гепатита С.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Вирус гепатита С (ВГС, HCV) — антропоноз; единственный источник (резервуар) возбудителя инфекции — человек, больной острым или хроническим гепатитом. ВГС относится к кровоконтактным инфекциям. Механизмы заражения: естественный (вертикальный — при передаче вируса от матери к ребенку, контактный — при использовании предметов быта и при половых контактах) и искусственный (артифициальный). Искусственный путь заражения может быть реализован посредством гемотрансфузий инфицированной крови или ее препаратов и любых парентеральных манипуляций (медицинского и немедицинского характера), сопровождающихся нарушением целостности кожного покрова и слизистых оболочек.

Вирус гепатита С относится к семейству Flaviviridae, роду Hepacivirus. Геном ВГС представлен однонитевой позитивной цепью РНК, длиной около 9600 нуклеотидных оснований (н.о.). Терминальные части генома ВГС представлены 5' и 3' нетранслируемыми регионами. Вирусная РНК содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин-предшественник размером 3010-3033 аминокислотных остатков, из которого в результате процессинга образуются структурные (core, E1, E2, p7) и неструктурные (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) белки. Структурные белки формируют вирусную частицу. Неструктурные белки участвуют в репликации генома ВГС и процессинге полипротеина-предшественника. Современная классификация включает 7 генотипов (1–7), подразделенных на 88 субтипов (a, b, c и т.д.), а также 9 межгенотипных рекомбинантных форм. Наибольшее распространение получили

и 6 субтипов ВГС (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a), которые признаны эпидемическими вариантами, обусловившими глобальное распространение инфекции на протяжении XX в. Частота встречаемости каждого из этих субтипов варьирует не только в разных географических зонах, но и в группах риска. Субтипы 1b, 2a и 2b преобладают у пациентов старшего возраста, имеющих в анамнезе переливание крови, хирургические, внутривенные вмешательства или контакты с препаратами крови, тогда как субтипы 1a и 3a ассоциированы с внутривенным введением наркотических средств.

Инфицирование HCV приводит к развитию ОГС, в 50—80% случаев протекающего в безжелтушной форме без клинических проявлений, в результате чего острую фазу (ОГС) заболевания диагностируют редко. Инкубационный период при ОГС колеблется от 2 до 26 нед (в среднем 6—8 нед). Клинические симптомы ОГС не имеют принципиальных отличий от таковых при других парентеральных гепатитах. Длительность преджелтушного периода составляет от нескольких дней до 2 нед; он может отсутствовать у 20% больных. ОГС протекает преимущественно в среднетяжелой форме, у 30% больных — в легкой. Возможно тяжелое течение болезни (редко), а фульминантный ОГС, приводящий к летальному исходу. При естественном течении 20-50% больных ОГС спонтанно выздоравливают, у остальных происходит развитие ХГС.

Для диагностики гепатита С доступны как серологические, так и молекулярно-генетические методы исследования. Для диагностики ОГС можно прибегнуть к выявлению вирусной РНК методом ПЦР, так как ее можно обнаружить уже в первые 1—2 нед заболевания, в то время как антитела появляются только через несколько недель. Использование тест-систем III поколения, значительно более чувствительных и специфичных, позволяет выявить анти-HCV в сыворотке крови уже через 7—10 дней от начала желтухи. Анти-HCV можно обнаружить как при ОГС, так и при ХГС. При этом анти-HCV IgM одинаково часто обнаруживают у больных как острым, так и хроническим гепатитом С. Кроме того, анти-HCV могут изолированно циркулировать в крови пациентов, которые выздоровели после ОГС или находятся в фазе ремиссии после элиминации РНК HCV в результате противовирусной терапии. Особенную диагностическую ценность для установления диагноза ОГС имеет обнаружение анти-ВГС в динамике болезни при отрицательном результате исследования в ранние сроки болезни. Современные тест-системы позволяют повысить выявляемость анти-HCV у 98—100% иммунокомпетентных инфицированных лиц.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	синтетические пептиды и рекомбинантные антигены ВГС, соответствующие участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS3, NS4, NS5) областями генома ВГС, сорбированные в лунках стрипов полистироловых планшетов с плоским дном для ИФА; каждый антиген сорбирован на отдельном стрипе; по краю стрипов нанесена маркировка в виде полосок: на стрипах с core-пепт. — одна полоса красного цвета, с core-рек. — две полосы красного цвета, с NS ₃ — одна полоса синего цвета, с NS ₄ -рек. — одна полоса зеленого цвета, с NS ₄ -пепт. — одна полоса черного цвета, с NS ₅ — одна полоса желтого цвета. Стрипы упакованы отдельно в пакеты.	core-p — 4 стр. core-p — 4 стр. NS ₃ -p — 4 стр. NS ₄ -p. — 4 стр. NS ₄ -п — 4 стр. NS ₅ -p — 4 стр
Контрольный положительный образец (K ⁺)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость малинового цвета	1 фл. (0,5 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость синего цвета.	1 фл. (1,0 мл)
Конъюгат	антитела диагностические против IgG и IgM	1 фл. (2,0 мл)

концентрат)	человека с пероксидазой хрена; прозрачная жидкость красного цвета	
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная, пенящаяся жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин.	2 фл. (по 40 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	опалесцирующая жидкость сине-фиолетового цвета, допускается выпадение незначительного осадка	2 фл. (по 12 мл)
Раствор для разведения конъюгата (РРК)	опалесцирующая жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, допускается выпадение незначительного осадка	2 фл. (по 12 мл)
Цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБР)	прозрачная, бесцветная жидкость	2 фл. (по 12 мл)
Хромоген (ТМБ)	раствор тетраметилбензидина; прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (2,5 мл)
Стоп-реагент	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (25 мл)
Одноразовые наконечники для автоматических пипеток		16 шт.

Примечания.

1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(x25), ЦБР, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование разных серий этих реагентов или их смешение.

3. Допускается использование ТМБ из разных серий набора.

4. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Принадлежности:

- вспомогательные пластиковые емкости (4 шт.),
- клейкая пленка для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Комплект № 2 – для подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С путем выявления спектра антител к каждому из антигенов отдельно при ручной постановке ИФА; рассчитан на проведение 32 анализов, включая контрольные образцы; предусмотрено дробное использование набора.

Комплект набора реагентов позволяют проводить отдельные исследования с использованием необходимого количества стрипов.

Рекомендуется следующая схема внесения контрольных и исследуемых образцов:

Кол-во стрипов с каждым антигеном/всего	1/6	2/12	3/18	4/24
Кол-во иссл. образцов	1-5	6-13	14-21	22-29

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемых образцах антител к вирусу гепатита С (ВГС), они взаимодействует с антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок иммуносорбента. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело" связывается с конъюгатом (антитела против иммуноглобулинов человека, конъюгированные с пероксидазой хрена). Комплекс антиген-антитело-конъюгат выявляется в цветной реакции с хромогеном.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Аналитическая специфичность.

Перекрестные иммунологические реакции не наблюдались с образцами биологического материала, содержащими маркеры других заболеваний (гепатиты А, В, Е; ВИЧ, сифилис, мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция).

Интерферирующие вещества (гемоглобин в концентрации до 200 г/л, билирубин в концентрации до 120 мкмоль/л и триглицериды в концентрации 11 ммоль/л) не влияют на результат анализа.

Диагностические характеристики:

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 99,50% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,97% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,40 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,01 % - 100 %

Диагностическая специфичность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,63 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,97 % - 100 %

Диагностическая специфичность на образцах биологического материала доноров (случайная выборка 10 000 образцов) составила: 99,97 % - 100 %

Коэффициент вариации не более 8%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003), в соответствии с требованиями СанПин 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

К+, К-, РРО содержат азид натрия в безопасной концентрации.

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" относится к классу Б (эпидемиологически опасные отходы) – инфицированные и потенциально инфицированные отходы, материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка, плазма (с гепарином, цитратом натрия, ЭДТА) крови человека объемом не менее 20 мкл., препараты, приготовленные из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин).

Для исследования образцов альбумина, криопреципитата, интерферона исходные растворы вносить согласно инструкции по применению данного набора, лиофильно высушенные препараты крови предварительно восстановить согласно инструкции по их применению. Препараты иммуноглобулинов перед исследованием развести ФСБ-Т в соотношении 1:5.

Образцы до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С. При необходимости более длительного хранения образцов сыворотки и плазмы рекомендуется разделить их на аликвоты и хранить при температуре от минус 20 до минус 70 °С. Размороженные образцы перед исследованием нужно тщательно перемешать.

При работе с размороженными образцами следует учитывать, что каждый цикл оттаивания-замораживания приводит к разрушению выявляемых антител, снижая качество исследуемого материала. С целью получения достоверных результатов исследования рекомендуется использовать только однократное замораживание-оттаивание образцов.

Для исключения ложноположительных результатов не рекомендуется анализировать сыворотки с повышенным содержанием липидов и/или с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Достоверность результатов анализа зависит от строгого соблюдения следующих правил:

- Используйте реагенты только данной серии набора (кроме ФСБ-Т(х25), ЦБР, ТМБ, стоп-реагента).
- Не используйте набор с истекшим сроком годности.
- В работе применяйте воду очищенную, соответствующую ФС.2.2.0020.18.
- Не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгата.
- Стеклопосуду тщательно мойте и ополаскивайте водой очищенной или используйте одноразовую посуду.
- Аккуратно разводите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металла. Поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и растворами субстратов.

Используйте для внесения каждой пробы сменный одноразовый наконечник.

- Никогда не используйте одну и ту же емкость, для приготовления конъюгата и раствора ТМБ.
- Проверьте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы.

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин,

Термостат на 37 °С,

Термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий встряхивание при 500 об/мин и поддерживающий температуру 37°С

Холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Анализатор иммуноферментный автоматический.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С. Иммуносорбент выдерживать в упакованном виде, для того чтобы избежать конденсации влаги внутри лунок.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

Используйте соотношения ФСБ-Т(х25) и воды очищенной, приведенные в таблице 1 для заданного числа стрипов.

Таблица 1

Число стрипов	6	12	18	24
ФСБ-Т(х25), мл	20	40	60	80
Вода очищенная, мл	до 500	до 1000	до 1500	до 2000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 190 сут, при температуре от 18 до 25 °С – не более 30 суток.

Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовить не менее чем за 10-20 мин до использования.

Конъюгат (концентрат) развести в РРК, используя объемы, указанные в таблице 2 для заданного числа стрипов. Необходимый объем РРК перенести в одноразовую емкость и добавить конъюгат в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 2

Число стрипов	6	12	18	24
РРК, мл	6	12	18	24
Конъюгат (концентрат), мл			...	...

Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК, определяется для каждой серии тест-системы.

Стабильность рабочего раствора конъюгата при температуре от 2 до 8 °С не более 30 сут, при температуре от 18 до 25 °С не более 7 сут. в защищенном от света месте.

Приготовление раствора хромогена (ТМБ)

Готовить перед использованием в месте, защищенном от воздействия прямого солнечного света.

ТМБ развести в ЦБР, используя объемы, указанные в таблице 3 для заданного числа стрипов. Необходимый объем ЦБР перенести в одноразовую емкость и добавить ТМБ в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 3

Число стрипов	6	12	18	24
ЦБР, мл	6	12	18	24
ТМБ, мл	0,6	1,2	1,8	2,4

Стабильность раствора хромогена при температуре от 18 до 25 °С не более 13 ч. в защищенном от света месте.

Примечание: Посуду и наконечники пипеток, контактировавшие с раствором хромогена, отмывать без применения синтетических моющих средств.

Приготовление остальных реагентов

РРО перед использованием необходимо тщательно перемешать из-за возможного выпадения осадка; иммуносорбент, К⁺, К⁻, стоп-реагент готовы к использованию.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты хранить в плотно закрытой упаковке при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Проведение ИФА

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из пакета планшет, вскрыв выше замка «zip-lock», и установить на рамку необходимое для проведения ИФА количество стрипов. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник.

Хранение вскрытого иммуносорбента возможно при температуре 2-8°С до истечения срока годности набора.

Расположить стрипы в рамке, в соответствии со схемой постановки.

Рекомендуемая схема постановки ИФА (на 2 стрипах с каждым антигеном):

	core- р	core- п	NS ₃ - р	NS ₄ - р.	NS ₄ - п	NS ₅ - р	core- р	core- п	NS ₃ - р	NS ₄ - р.	NS ₄ - п	NS ₅ - р
A	K ⁺	K ⁺	K ⁺	K ⁺	K ⁺	K ⁺	№6	№6	№6	№6	№6	№6
B	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	№7	№7	№7	№7	№7	№7
C	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	№8	№8	№8	№8	№8	№8
D	№1	№1	№1	№1	№1	№1	№9	№9	№9	№9	№9	№9
E	№2	№2	№2	№2	№2	№2	№10	№10	№10	№10	№10	№10
F	№3	№3	№3	№3	№3	№3	№11	№11	№11	№11	№11	№11
H	№4	№4	№4	№4	№4	№4	№12	№12	№12	№12	№12	№12
G	№5	№5	№5	№5	№5	№5	№13	№13	№13	№13	№13	№13

2. В каждую лунку вносят по 80 мкл РРО.

3. В каждую лунку стрипа с каждым антигеном (например, А) вносят по 20 мкл К⁺, в две лунки (например, В и С) – по 20 мкл К⁻, в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов, затем тщательно перемешать пипетированием (не менее 3 раз) или на шейкере на малой скорости (100 об/мин) в течение 30 с, цвет РРО при этом должен измениться с сине-фиолетового на зеленый.

4. Планшет закрывают крышкой или клейкой пленкой.

Инкубируют согласно выбранной процедуре:

Процедура №1 - 30 мин при 37°С на шейкере (500 об/мин), либо

Процедура №2 - 1 ч при 37 °С в термостате.

5. По окончании инкубации аспирируют содержимое лунок и промывают лунки планшета 4 раза промывочным раствором, добавляя в каждую лунку не менее 400 мкл жидкости. Время между заполнением и аспирацией (замачивание) должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки удалить влагу из лунок, постукивая планшетом по фильтрованной бумаге.

Рекомендуется использовать:

- режим отмывки с переполнением – «overflow» - с внесением в лунки по 600-700 мкл рабочего промывочного раствора;

- поперечную аспирацию раствора из лунок – режим «crosswise».

Необходимо следить за полной аспирацией после каждого цикла отмывки (остаточный объем в лунках не должен превышать 10 мкл). Сохранность иммуносорбента между операциями 15 минут.

6. Перемешивают рабочий раствор конъюгата и вносят его по 100 мкл в каждую лунку. Планшет закрывают крышкой или пленкой и выдерживают при температуре 37 °С 30 мин в термостате.

7. Планшет промывают ФСБ-Т 6 раз с использованием обычного промывающего устройства или 4 раза в режиме "overflow" (см. п. 5).

8. В каждую лунку внести по 100 мкл свежеприготовленного раствора хромогена, выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте (планшет не закрывать) или в термостате при температуре 37 °С в течение 15 мин. (планшет закрыть чистой защитной пленкой).

9. В каждую лунку (в той же последовательности, в которой вносился раствор хромогена) внести по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 минуты, но не позднее, чем через 40 минут учесть результаты реакции.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при соблюдении следующих условий:

оптическая плотность в лунках с K^+ ($ОП_{K^+}$) - не менее 0,5;

оптическая плотность в лунках с K^- ($ОП_{K^-}$) - не более 0,25.

В противном случае исследование повторить.

Рассчитать критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{K-ср} + 0,150;$$

где $ОП_{K-ср}$ – среднее значение ОП в лунках с K^- .

Результаты учитывать по каждому антигену отдельно.

Образцы с ОП ниже $ОП_{крит}$ по всем антигенам считают отрицательными (не содержащими антител к ВГС).

Образцы с ОП, большей или равной $ОП_{крит}$ по двум одноименным или двум (и более) разноименным антигенам, считают положительными.

Образцы с ОП, большей или равной $ОП_{крит}$ по одному антигену, считают неопределенными. Неопределенные образцы должны быть исследованы в других подтверждающих тестах (иммуноблоттинг, ПЦР-анализ) или повторным исследованием сыворотки (плазмы) крови данного пациента в системе «ИФА-ВГС» через 3-6 месяцев.

Для интерпретации результатов исследования сывороток можно использовать коэффициент позитивности (КП), который рассчитывается по формуле:

$$КП = \frac{ОП_{иссл.сыв.}}{ОП_{крит.}}$$

Если $КП \geq 1,0$, исследуемый образец расценивать как положительный. Результат анализа считать отрицательным при $КП < 1,0$.

Все положительные образцы должны быть исследованы в подтверждающих ПЦР-тестах.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 2 года. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Транспортирование

Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 15 сут. Замораживание не допускается.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС», соответствует Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности (см. Сведения о нормативной документации).

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ИФА-ВГС», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. 8 (49643) 3-23-11, 3-30-93, тел/факс 8(49643) 3-30-85, 8(800) 333-33-47.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по науке

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

«14» 01 2021 г.

С.Г. Марданлы

П.К. Варнавичус

СВОДНАЯ ТАБЛИЦА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ РЕАГЕНТОВ

Кол-во стрипов	6	12	18	24
ФСБ-Т				
ФСБ-Т(х25), мл	20	40	60	80
Вода очищ., мл	до 500	до 1000	до 1500	до 2000
Рабочий раствор конъюгата				
РРК, мл	6	12	18	24
Конъюгат (концентрат) ¹ , мкл			...	...
Раствор хромогена				
ЦБР, мл	6	12	18	24
ТМБ, мл	0,6	1,2	1,8	2,4

¹Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК; указывается для каждой серии тест-системы.

КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

«ИФА-ВГС»

Комплект № 2

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в каждую лунку – по 80 мкл РРО; в одну лунку стрипа с каждым антигеном – 20 мкл K ⁺ , в две лунки – по 20 мкл K ⁻ , в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов
Инкубация	Процедура 1 30 мин при 37 °С на шейкере (500 об/мин) или Процедура 2 1 ч при 37 °С, в термостате
Промыть	4 раза ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата
Инкубация	30 мин, 37 °С в термостате
Промыть	4 раза в режиме "overflow" или 6 раз ФСБ-Т (обычное промывающее устройство)
Внести	по 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 18-25 °С или в термостате при температуре 37 °С в течение 15 мин
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), "бланк" - по воздуху

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 10 ЛИСТОВ

» 04 2022 год

Ген. Директор
ООО «РЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус Г.К.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

лист 06
Ген. директор ЗАО "ЭКОлаб"
Гашенко Т.Ю.
2022 г.

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"

Т.Ю.Гашенко
2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С»
«ИФА-ВГС»

Комплекты № 2/1, 2/2

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС» предназначен для качественного выявления и подтверждения наличия антител классов IgG и IgM к антигенам вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке (плазме) крови человека, а также препаратах, приготовленных из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин) методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Функциональное назначение: скрининг, подтверждение и диагностика. Применение изделия не имеет популяционных и демографических ограничений.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики in vitro.

Показания и противопоказания к применению изделия

Основные показания к применению: профилактическое обследование доноров, лиц из групп риска, при подготовке к госпитализации, оперативному вмешательству, беременности, диагностика острой фазы гепатита С, диагностика хронического гепатита С.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Вирус гепатита С (ВГС, HCV) — антропоноз; единственный источник (резервуар) возбудителя инфекции — человек, больной острым или хроническим гепатитом. ВГС относится к кровоконтактным инфекциям. Механизмы заражения: естественный (вертикальный — при передаче вируса от матери к ребенку, контактный — при использовании предметов быта и при половых контактах) и искусственный (артифициальный). Искусственный путь заражения может быть реализован посредством гемотрансфузий инфицированной крови или ее препаратов и любых парентеральных манипуляций (медицинского и немедицинского характера), сопровождающихся нарушением целостности кожного покрова и слизистых оболочек.

Вирус гепатита С относится к семейству Flaviviridae, роду Hepacivirus. Геном ВГС представлен однонитевой позитивной цепью РНК, длиной около 9600 нуклеотидных оснований (н.о.). Терминальные части генома ВГС представлены 5' и 3' нетранслируемыми регионами. Вирусная РНК содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин-предшественник размером 3010-3033 аминокислотных остатков, из которого в результате процессинга образуются структурные (core, E1, E2, p7) и неструктурные (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) белки. Структурные белки формируют вирусную частицу. Неструктурные белки участвуют в репликации генома ВГС и процессинге полипротеина-предшественника. Современная классификация включает 7 генотипов (1–7), подразделенных на 88 субтипов (a, b, c и т.д.), а также 9 межгенотипных рекомбинантных форм. Наибольшее распространение получили всего 6 субтипов ВГС (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a), которые признаны эпидемическими

С-вариантами, обусловившими глобальное распространение инфекции на протяжении XX в. Частота встречаемости каждого из этих субтипов варьирует не только в разных географических зонах, но и в группах риска. Субтипы 1b, 2a и 2b преобладают у пациентов старшего возраста, имеющих в анамнезе переливание крови, хирургические, внутривенные вмешательства или контакты с препаратами крови, тогда как субтипы 1a и 3a ассоциированы с внутривенным введением наркотических средств.

Инфицирование HCV приводит к развитию ОГС, в 50—80% случаев протекающего в безжелтушной форме без клинических проявлений, в результате чего острую фазу (ОГС) заболевания диагностируют редко. Инкубационный период при ОГС колеблется от 2 до 26 нед (в среднем 6—8 нед). Клинические симптомы ОГС не имеют принципиальных отличий от таковых при других парентеральных гепатитах. Длительность преджелтушного периода составляет от нескольких дней до 2 нед; он может отсутствовать у 20% больных. ОГС протекает преимущественно в среднетяжелой форме, у 30% больных — в легкой. Возможно тяжелое течение болезни (редко), а фульминантный ОГС, приводящий к летальному исходу. При естественном течении 20-50% больных ОГС спонтанно выздоравливают, у остальных происходит развитие ХГС.

Для диагностики гепатита С доступны как серологические, так и молекулярно-генетические методы исследования. Для диагностики ОГС можно прибегнуть к выявлению вирусной РНК методом ПЦР, так как ее можно обнаружить уже в первые 1—2 нед заболевания, в то время как антитела появляются только через несколько недель. Использование тест-систем III поколения, значительно более чувствительных и специфичных, позволяет выявить анти-HCV в сыворотке крови уже через 7—10 дней от начала желтухи. Анти-HCV можно обнаружить как при ОГС, так и при ХГС. При этом анти-HCV IgM одинаково часто обнаруживают у больных как острым, так и хроническим гепатитом С. Кроме того, анти-HCV могут изолированно циркулировать в крови пациентов, которые выздоровели после ОГС или находятся в фазе ремиссии после элиминации РНК HCV в результате противовирусной терапии. Особенную диагностическую ценность для установления диагноза ОГС имеет обнаружение анти-ВГС в динамике болезни при отрицательном результате исследования в ранние сроки болезни. Современные тест-системы позволяют повысить выявляемость анти-HCV у 98—100% иммунокомпетентных инфицированных лиц.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

		Комплект № 2/1	Комплект № 2/2
Иммуносорбент	рекомбинантные антигены ВГС, соответствующие участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS3, NS4, NS5) областями генома ВГС, сорбированные в лунках стрипов полистироловых планшетов с плоским дном для ИФА; каждый антиген (core, NS ₃ , NS ₄ , NS ₅) сорбирован на отдельном стрипе; по краю стрипов нанесена маркировка в виде полос: на стрипах с core-Ag — красного цвета, с NS ₃ -Ag — синего цвета, с NS ₄ -Ag — зеленого цвета, с NS ₅ -Ag — желтого цвета.	core — 3 стр. NS ₃ — 3 стр. NS ₄ — 3 стр. NS ₅ — 3 стр.	core — 15 стр. NS ₃ — 15 стр. NS ₄ — 15 стр. NS ₅ — 15 стр.
Контрольный положительный образец (K ⁺)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость малинового цвета	1 фл. (0,5 мл)	1 фл. (3,0 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	инактивированный; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость синего цвета.	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (4,0 мл)
Конъюгат	антитела диагностические против IgG и	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (5,0 мл)

концентрат)	IgM человека с пероксидазой хрена; прозрачная жидкость красного цвета		
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(х25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная, пенящаяся жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин.	1 фл. (40 мл)	2 фл. (по 100 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	опалесцирующая жидкость сине-фиолетового цвета, допускается выпадение незначительного осадка	1 фл. (13 мл)	5 фл. (по 15 мл)
Раствор для разведения конъюгата (РРК)	опалесцирующая жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, допускается выпадение незначительного осадка	1 фл. (13 мл)	5 фл. (по 20 мл)
Цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБР)	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (13 мл)	5 фл. (по 20 мл)
Хромоген (ТМБ)	раствор тетраметилбензидина; прозрачная жидкость розового цвета	1 фл. (1,3 мл)	1 фл. (11 мл)
Стоп-реагент	прозрачная, бесцветная жидкость	1 фл. (12,5 мл)	1 фл. (70 мл)
Одноразовые наконечники для автоматических пипеток		16 шт.	32 шт.

Примечания.

1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(х25), ЦБР, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование разных серий этих реагентов или их смешение.

3. Допускается использование ТМБ из разных серий набора.

4. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Принадлежности:

- вспомогательные пластиковые емкости: Комплект №2/1 - 4 шт., Комплект №2/2 – 8 шт.
- клейкая пленка для планшетов: Комплект №2/1 - 4 шт., Комплект №2/2 – 8 шт.

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Комплект № 2/1 – для подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С путем выявления спектра антител к каждому из антигенов отдельно при ручной постановке ИФА; рассчитан на проведение 24 анализов, включая контрольные образцы или для одновременной постановки 24 определений на автоматических анализаторах для ИФА открытого типа; предусмотрено детальное использование набора.

Комплект № 2/2 – для подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С путем выявления спектра антител к каждому из антигенов при ручной постановке ИФА или с

с использованием ИФА-анализатора открытого типа; рассчитан на проведение 120 анализов, включая контрольные образцы; предусмотрено дробное использование набора

Комплекты набора реагентов позволяют проводить отдельные исследования с использованием необходимого количества стрипов.

Рекомендуется следующая схема внесения контрольных и исследуемых образцов:

Кол-во стрипов с каждым антигеном/всего	1/4	2/8	3/12
Кол-во исслед. образцов	1-5	6-13	14-21

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемых образцах антител к вирусу гепатита С (ВГС), они взаимодействуют с антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок иммуносорбента. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело" связывается с конъюгатом (антитела против иммуноглобулинов человека, конъюгированные с пероксидазой хрена). Комплекс антиген-антитело-конъюгат выявляется в цветной реакции с хромогеном.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С (СОП-038) как процентное содержание образцов, не содержащих иммуноглобулины к вирусу гепатита С, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Аналитическая специфичность.

Перекрестные иммунологические реакции не наблюдались с образцами биологического материала, содержащими маркеры других заболеваний (гепатиты А, В, Е; ВИЧ, сифилис, мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция).

Интерферирующие вещества (гемоглобин в концентрации до 200 г/л, билирубин в концентрации до 120 мкмоль/л и триглицериды в концентрации 11 ммоль/л) не влияют на результат анализа.

Диагностические характеристики:

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 99,50% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,97% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,40 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,01 % - 100 %

Диагностическая специфичность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,63 % - 100 %

Плазма крови человека: 99,97 % - 100 %

Диагностическая специфичность на образцах биологического материала доноров (случайная выборка 10 000 образцов) составила: 99,97 % - 100 %

Коэффициент вариации не более 8%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинично-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003), в соответствии с требованиями СанПин 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

К+, К-, РРО содержат азид натрия в безопасной концентрации.

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" относится к классу Б (эпидемиологически опасные отходы) – инфицированные и потенциально инфицированные отходы, материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка, плазма (с гепарином, цитратом натрия, ЭДТА) крови человека объемом не менее 20 мкл., препараты, приготовленные из крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин). Для исследования образцов альбумина, криопреципитата, интерферона исходные растворы вносить согласно инструкции по применению данного набора, лиофильно высушенные препараты крови предварительно восстановить согласно инструкции по их применению. Препараты иммуноглобулинов перед исследованием развести ФСБ-Т в соотношении 1:5. Образцы до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С. При необходимости более длительного хранения образцов сыворотки и плазмы рекомендуется разделить их на аликвоты и хранить при температуре от минус 20 до минус 70 °С. Размороженные образцы перед исследованием нужно тщательно перемешать.

При работе с размороженными образцами следует учитывать, что каждый цикл оттаивания-замораживания приводит к разрушению выявляемых антител, снижая качество исследуемого материала. С целью получения достоверных результатов исследования рекомендуется использовать только однократное замораживание-оттаивание образцов.

Для исключения ложноположительных результатов не рекомендуется анализировать сыворотки с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Достоверность результатов анализа зависит от строгого соблюдения следующих правил:

- Используйте реагенты только данной серии набора (кроме ФСБ-Т(х25), ЦБР, ТМБ, стоп-реагента).
- Не используйте набор с истекшим сроком годности.
- В работе применяйте воду очищенную, соответствующую ФС.2.2.0020.18.
- Не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгата.
- Стеклопосуду тщательно мойте и ополаскивайте водой очищенной или используйте одноразовую посуду.
- Аккуратно разводите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металла. Поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и растворами субстратов.
- Используйте для внесения каждой пробы сменный одноразовый наконечник.
- Никогда не используйте одну и ту же емкость, для приготовления конъюгата и раствора ТМБ.
- Проверьте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы.

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин,

Термостат на 37 °С,

Термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий встряхивание при 500 об/мин и поддерживающий температуру 37 °С

Холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Анализатор иммуноферментный автоматический.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С. Иммуносорбент выдерживать в упакованном виде, для того чтобы избежать конденсации влаги внутри лунок.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

Используйте соотношения ФСБ-Т(х25) и воды очищенной, приведенные в таблице 1 для заданного числа стрипов.

Таблица 1

Кол-во стрипов	4	8	12
ФСБ-Т(х25) мл	13	27	40
Вода очищ., мл	до 325	до 675	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 190 сут, при температуре от 18 до 25 °С – не более 30 суток.

Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовить не менее чем за 10-20 мин до использования.

Конъюгат (концентрат) развести в РРК, используя объемы, указанные в таблице 2 для заданного числа стрипов. Необходимый объем РРК перенести в одноразовую емкость и добавить конъюгат в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 2

Кол-во стрипов	4	8	12
РРК, мл	4	8	12
Конъюгат (концентрат), мкл	...	...	...

Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК, определяется для каждой серии тест-системы.

Стабильность рабочего раствора конъюгата при температуре от 2 до 8 °С не более 30 сут, при температуре от 18 до 25 °С не более 7 сут. в защищенном от света месте.

Приготовление раствора хромогена (ТМБ)

Готовить перед использованием в месте, защищенном от воздействия прямого солнечного света.

ТМБ развести в ЦБР, используя объемы, указанные в таблице 3 для заданного числа стрипов. Необходимый объем ЦБР перенести в одноразовую емкость и добавить ТМБ в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 3

Кол-во стрипов	4	8	12
ЦБР, мл	4	8	12
ТМБ, мл	0,4	0,8	1,2

Стабильность раствора хромогена при температуре от 18 до 25 °С не более 13 ч. в защищенном от света месте.

Примечание: Посуду и наконечники пипеток, контактировавшие с раствором хромогена, отмывать без применения синтетических моющих средств.

Приготовление остальных реагентов

РРО перед использованием необходимо тщательно перемешать из-за возможного выпадения осадка; иммуносорбент, K^+ , K^- , стоп-реагент готовы к использованию.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты хранить в плотно закрытой упаковке при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Проведение ИФА

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из пакета планшет, вскрыв выше замка «zip-lock», и установить на рамку необходимое для проведения ИФА количество стрипов. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник.

Хранение вскрытого иммуносорбента возможно при температуре 2-8°С до истечения срока годности набора.

Расположить стрипы в рамке, в соответствии со схемой постановки.

Рекомендуемая схема постановки ИФА (на 3 стрипах с каждым антигеном):

	core	NS ₃	NS ₄	NS ₅	core	NS ₃	NS ₄	NS ₅	core	NS ₃	NS ₄	NS ₅
A	K^+	K^+	K^+	K^+	№6	№6	№6	№6	№14	№14	№14	№14
B	K^-	K^-	K^-	K^-	№7	№7	№7	№7	№15	№15	№15	№15
C	K^-	K^-	K^-	K^-	№8	№8	№8	№8	№16	№16	№16	№16
D	№1	№1	№1	№1	№9	№9	№9	№9	№17	№17	№17	№17
E	№2	№2	№2	№2	№10	№10	№10	№10	№18	№18	№18	№18
F	№3	№3	№3	№3	№11	№11	№11	№11	№19	№19	№19	№19
H	№4	№4	№4	№4	№12	№12	№12	№12	№20	№20	№20	№20

2. В каждую лунку вносят по 80 мкл РРО.

3. В каждую лунку стрипа с каждым антигеном (например, А) вносят по 20 мкл K^+ , в две лунки (например, В и С) – по 20 мкл K^- , в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов, затем тщательно перемешать пипетированием (не менее 3 раз) или на шейкере на малой скорости (100 об/мин) в течение 30 с, цвет РРО при этом должен измениться с сине-фиолетового на зеленый.

4. Планшет закрывают крышкой или клейкой пленкой.

Инкубируют согласно выбранной процедуре:

Процедура №1 - 30 мин при 37°C на шейкере (500 об/мин), либо

Процедура №2 - 1 ч при 37 °C в термостате.

5. По окончании инкубации аспирируют содержимое лунок и промывают лунки планшета 4 раза промывочным раствором, добавляя в каждую лунку не менее 400 мкл жидкости. Время между заполнением и аспирацией (замачивание) должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки удалить влагу из лунок, постукивая планшетом по фильтрованной бумаге.

Рекомендуется использовать:

- режим отмытки с переполнением – «overflow» - с внесением в лунки по 600-700 мкл рабочего промывочного раствора;

- поперечную аспирацию раствора из лунок – режим «crosswise».

Необходимо следить за полной аспирацией после каждого цикла отмытки (остаточный объем в лунках не должен превышать 10 мкл). Сохранность иммуносorbента между операциями 15 минут.

6. Перемешивают рабочий раствор конъюгата и вносят его по 100 мкл в каждую лунку. Планшет закрывают крышкой или пленкой и выдерживают при температуре 37 °C 30 мин в термостате.

7. Планшет промывают ФСБ-Т 6 раз с использованием обычного промывающего устройства или 4 раза в режиме "overflow" (см. п. 5).

8. В каждую лунку внести по 100 мкл свежеприготовленного раствора хромогена, выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °C в защищенном от света месте (планшет не закрывать) или в термостате при температуре 37 °C в течение 15 мин. (планшет закрыть чистой защитной пленкой).

9. В каждую лунку (в той же последовательности, в которой вносился раствор хромогена) внести по 100 мкл стоп-реактанта и через 2-3 минуты, но не позднее, чем через 40 минут учесть результаты реакции.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при соблюдении следующих условий:

оптическая плотность в лунках с K^+ ($ОП_{K^+}$) - не менее 0,5;

оптическая плотность в лунках с K^- ($ОП_{K^-}$) - не более 0,25.

В противном случае исследование повторить.

Рассчитать критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{K-ср} + 0,150;$$

где $ОП_{K-ср}$ – среднее значение ОП в лунках с K^- .

Результаты учитывать по каждому антигену отдельно.

Образец учитывать как отрицательный (не содержащий антител к ВГС), если значение ОП в лунке с ним ниже $ОП_{крит}$ для каждого антигена.

Образец учитывать как положительный (содержащий антитела к ВГС), если значение ОП в лунке с ним выше или равно $ОП_{крит}$ по двум или более антигенам, а также по одному Сое-антигену.

Образец учитывать как сомнительный, если значение ОП в лунке с ним выше или равно $ОП_{крит}$ только по одному неструктурному (NS_3 , NS_4 или NS_5) антигену.

Образцы с ОП, большей или равной ОП_{крит} только по одному неструктурному (NS₃, NS₄ или NS₅) антигену, считают неопределенными. Неопределенные образцы должны быть исследованы в других подтверждающих тестах (иммуноблотинг, ПЦР-анализ) или повторным исследованием сыворотки (плазмы) крови данного пациента в системе "ИФА-ВГС" через 3-6 месяцев.

Для интерпретации результатов исследования сывороток можно использовать коэффициент позитивности (КП), который рассчитывается по формуле:

$$КП = \frac{ОП_{иссл.сыв.}}{ОП_{крит.}}$$

Если КП ≥ 1,0, исследуемый образец расценивать как положительный. Результат анализа считать отрицательным при КП < 1,0.

Все положительные образцы должны быть исследованы в подтверждающих ПЦР-тестах.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

Приготовить ФСБ-Т, рабочий раствор конъюгата и раствор хромогена, используя реагенты и их соотношения, указанные в таблице 4 для проведения исследования на одном планшете.

Таблица 4

ФСБ-Т		Рабочий раствор конъюгата		Раствор хромогена	
ФСБ-Т(х25), мл	Вода очищенная, мл	Конъюгат (концентрат) ¹ , мкл	РРК, мл	ТМБ, мл	ЦБР, мл
40	до 1000	...	20 мл	2,0	20

¹Объем конъюгата (концентрат), вносимый в РРК, определяется для каждой серии тест-системы.

Спектрофотометрический контроль стадий ИФА при постановке на автоматических анализаторах.

Контроль внесения исследуемых образцов и конъюгата проводить при длине волны 450 нм. При этом ОП > 0,1.

Контроль внесения рабочего раствора хромогена проводить при длине волны 450 нм. При этом ОП > 0,08.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 2 года. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.



Транспортирование

Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 15 сут. Замораживание не допускается.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С» «ИФА-ВГС», соответствует Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности (см. Сведения о нормативной документации).

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ИФА-ВГС», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. 8 (49643) 3-23-11, 3-30-93, тел/факс 8(49643) 3-30-85, 8 (800) 333-33-47.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по науке

С.Г. Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

«14» 01 2022 г.

П.К. Варнавичус



СВОДНАЯ ТАБЛИЦА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ РЕАГЕНТОВ

Кол-во стрипов	6	12	18
ФСБ-Т			
ФСБ-Т(х25), мл	13	27	40
Вода очищ., мл	до 325	до 675	до 1000
Рабочий раствор конъюгата			
РРК, мл	4	8	12
Конъюгат (концентрат) ¹ , мкл	...	...	...
Раствор хромогена			
ЦБР, мл	4	8	12
ТМБ, мл	0,4	0,8	1,2

¹Объем конъюгата (концентрата), вносимый в РРК; указывается для каждой серии тест-системы.

КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

«ИФА-ВГС»

Комплекты № 2/1, 2/2

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в каждую лунку – по 80 мкл РРО; в одну лунку стрипа с каждым антигеном – 20 мкл K ⁺ , в две лунки – по 20 мкл K ⁻ , в остальные лунки – по 20 мкл исследуемых образцов
Инкубация	Процедура 1 30 мин при 37 °С на шейкере (500 об/мин) или Процедура 2 1 ч при 37 °С, в термостате
Промыть	4 раза ФСБ-Т
Внести	во все лунки по 100 мкл рабочего разведения конъюгата
Инкубация	30 мин, 37 °С в термостате
Промыть	4 раза в режиме "overflow" или 6 раз ФСБ-Т (обычное промывающее устройство)
Внести	по 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 18-25 °С или в термостате при температуре 37 °С в течение 15 мин
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), "бланк" - по воздуху

ПРОШУ
В КОЛИЧЕСТВЕ 11 ЛИСТОВ

» 2021 год

Ген. директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус Г.К.

Пронумеровано, пронумеровано
и скреплено печатью

лист 06
Ген. директор ЗАО «ЭКОлаб»
Гашенко Т.Ю.
"11" 01 2021 г.