

CERTIFICATE

MANAGEMENT SYSTEM CERTIFICATION BODY
«CONFORMITY ASSESSMENT BODY «PROMSTANDART», LLC
certifies that the enterprise

EKVITESTLAB
Limited Liability Company

registration code 38745936

legal address:

Ukraine, 03150, Kyiv, 114 Velyka Vasylkivska street,

manufacturer's address:

Ukraine, 04212, Kyiv, 60/2 Peremohy Avenue



has established and applies quality management system for
development, production, storage and sale
of ELISA kits for in vitro diagnostic

Audit, № report 2020/015-20.2.1
confirmed that the requirements

ISO 13485:2016

**«Medical devices — Quality management systems —
Requirements for regulatory purposes»**

are performed.

The control of conformity of the certified quality management system to the requirements of the specified standard is carried out by means of supervisory audit, the periodicity and procedures of which are regulated by the program.

Certificate registration number № UA.QMS.00014-21
Registered 06 April 2021
Valid until 05 April 2024



80156
DSTU EN ISO/IEC 17021-1

Director of Certification Body
«CAB «PROMSTANDART», LLC



Sergiy Dubrovskiy

210107

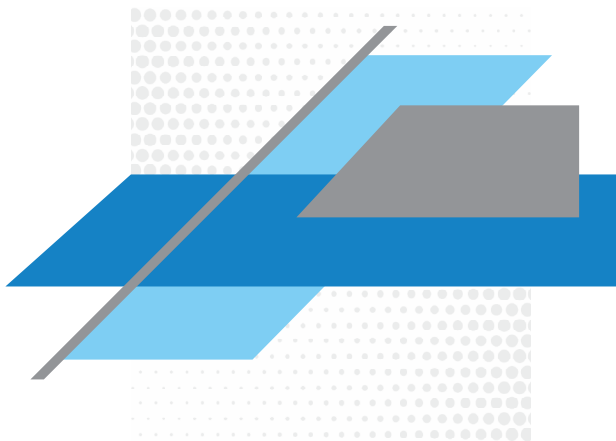
The validity of certificate can be verified by telephone: (056) 742-82-39
or on website of «CAB «PROMSTANDART», LLC: prom-standart.com.ua



anti-HBs

**ИФА-набор качественного определения
суммарных антител к поверхностному антигену
вируса гепатита В**

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-017

Σ 96
анализов


UA.TR.061

EQUI anti-HBs

ИФА-набор для качественного определения суммарных антител к поверхностному антигену вируса гепатита В

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ИФА-набор «EQUI anti-HBs» предназначен для качественного определения суммарных антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики перенесенного гепатита В и оценки протективного иммунитета. Использование комплекта калибраторов «EQUI anti-HBs Calibrators» с набором «EQUI anti-HBs» позволяет проводить количественное определение суммарных антител к HBsAg. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и для автоматического иммуноферментного анализатора «открытого» типа.

Целевая группа: доноры; лица-потребители инъекционных наркотиков; реципиенты крови или органов; беременные женщины; дети, рожденные от инфицированных матерей; лица, инфицированные ВИЧ; пациенты с симптомами заболеваний печени.

Применение: ИФА-набор применяется в клинических диагностических лабораториях, в станциях переливания крови, а также в других учреждениях, работающих в области *in vitro* диагностики.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Одним из самых распространенных заболеваний печени является гепатит В. Его этиологический агент - вирус гепатита В (ВГВ). ВГВ относится к семейству *Herpesviridae* и содержит двухцепочечную ДНК. Инфекционной формой вируса являются так называемые «частицы Дейна» диаметром 42-49 нм, в белковом составе которых основными являются поверхностный антиген (HBsAg) и коревой антиген (HBeAg).

Клиническая картина гепатита В не позволяет диагностировать его длительное время и отличить от других вирусных гепатитов. Поэтому для скрининговых исследований и подтверждения диагноза важную роль играет лабораторная диагностика, особенно выявления антигенов ВГВ и антител к ним методом ИФА. Первым и основным маркером гепатита В является HBsAg, который обнаруживается в крови через 3-5 недель после инфицирования. Примерно в то же время в крови можно обнаружить ДНК ВГВ и HBeAg, который считается маркером активной репликации вируса и «заразности» крови. ВОЗ рекомендует проводить проверку всей донорской крови на HBsAg, чтобы предотвратить трансмиссивной передачи ВГВ. Через 2-3 недели после появления HBsAg появляются антитела IgM к коровому антигену HBeAg, а вскоре после них – анти HBeAg IgG, которые быстро достигают высоких уровней. Выздоровление от острого гепатита В сопровождается выводом вируса из организма, перестают проявляться HBsAg и анти-HBe IgM, появляются антитела к HBeAg. Антитела IgG

к коровому антигену персистируют в течение всей жизни и являются маркером имеющегося или перенесенного гепатита В, их уровень в крови снижается медленно. Через несколько месяцев после исчезновения из крови HBsAg начинают проявляться анти-HBs антитела, которые являются свидетельством перенесенного гепатита В и наличия иммунитета. В период «серологического окна» между выводом HBsAg и появлением анти-HBs антител маркером инфекции ВГВ является суммарные антитела к коровому антигену, также могут проявляться анти-HBe антитела.

Если после острой фазы не происходит элиминация вируса и не появляются анти-HBs антитела, развивается хронический гепатит В. HBsAg продолжает определяться более 6 месяцев, его количество в крови может значительно колебаться. На репликативной стадии хронического гепатита В оказывается ДНК вируса и HBeAg, антител к HBeAg нет.

ВОЗ рекомендует диагностировать острый гепатит В с наличием HBsAg и антител IgM к HBsAg, а хронический - за стойким присутствием HBsAg в течение не менее шести месяцев.

Главным средством профилактики гепатита В является вакцинация, которая рекомендована в первую очередь новорожденным. После вакцинации организмом вырабатываются анти-HBs антитела и формируется иммунитет у лиц, которые не сталкивались с вирусом гепатита В. Наличие анти-HBs антител на уровне более 10 IU / л (МЕ / л) принято считать нижней границей протективного иммунитета вследствие вакцинации или перенесенного гепатита В.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Выявление специфических антител к HBsAg в ИФА-наборе «EQUI anti-HBs» базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбирован рекомбинантный HBsAg субтипов ad та ау. В каждую лунку добавляются образцы сыворотки или плазмы пациента и конъюгат рекомбинантных белков - аналогов HBsAg, с пероксидазой хрена. Во время инкубации, в случае наличия антител к HBsAg в образце, на твердой фазе формируется комплекс антиген-антитело-антиген («сэндвич»). Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Иммунные комплексы оказываются путем добавления раствора хромогена 3,3',5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-ти минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450 / 620-695nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

Планшет ИФА

STRIPS

1 x 96
лунок

В лунках планшета засорбированы рекомбинантные белки - аналоги HBsAg субтипов ad та ay. Лунки можна отделять. После первого вскрытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не больше 6 месяцев.

Позитивный контроль

CONTROL +

1 x 1,6 ml

Раствор специфичных HBsAg иммуноглобулинов с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C

Отрицательный контроль

CONTROL -

2 x 1,6 ml

Отрицательная сыворотка крови с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C

Конъюгат (11x концентрат)

CONJ|11x

1 x 0,6 ml

11-ти кратный концентрат конъюгата рекомбинантных HBsAg субтипов ad и ay с пероксидазой хрена в буферном растворе со стабилизаторами (фиолетовый).

Развести конъюгат (11x) 1:11 раствором для разведения конъюгату перед использованием (например, 30 µl концентрата + 300 µl раствора для разведения, достаточно для 8 лунок). Разведенный раствор хранить при температуре 2-8 °C не более 1 суток.

Раствор для розведения конъюгата

DIL|CONJ

1 x 6 ml

Буферный раствор с белками плазмы крови крупного рогатого скота, детергентом и консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C

Раствор ТМБ (готовый к использованию)

SOLN|TMB

1 x 13 ml

Раствор ТМБ, H₂O₂, стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

Раствор для промывки TWEEN (20x концентрат)

TWEEN|WASH|20x

1 x 50 ml

20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 (бесцветный). Развести раствор для промывки TWEEN (20x) 1:20 дистиллированной или деионизированной водой (например, 5 ml концентрата + 95 ml воды для 8 лунок) перед использованием. Разведенный раствор хранить при температуре 2-8°C не больше 7 суток.

Стоп-раствор (готовый к использованию)

SOLN|STOP

1 x 13 ml

Раствор 0,5 mol H₂SO₄ (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

В состав набора также входят: клейкая пленка (2 шт.), схема внесения образцов (1 шт.), лист контрольных испытаний и инструкция по применению.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники для них, мерная лабораторная посуда (10–1000 ml), деионизированная или дистиллированная вода, термостат на 37°C, деионизированная или дистиллированная вода, термостат на 450/620-695 nm, соответствующие контейнеры для отходов потенциально зараженного материала, таймер, фильтровальная бумага, одноразовые неопудренные перчатки, дезинфицирующие средства.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

Перед проведением анализа внимательно ознакомьтесь с инструкцией по использованию. Достоверность результата зависит от четкого следования процедуре анализа.

- не используйте компоненты ИФА-набора после окончания срока годности;
- не используйте во время анализа и не смешивайте компоненты разных серий, компоненты из наборов разных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с набором «EQUI anti-HBs»;
- не замораживайте ИФА-набор или его компоненты;
- после использования реагента закрывайте каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролируйте наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз используйте новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегайте попадания прямых солнечных лучей на реагенты ИФА-набора;
- **SOLN|TMB** должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегайте контакта **SOLN|TMB** с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно выполосканную дистиллированной водой посуду;
- не используйте реагенты, цвет которых не соответствует указанному в пункте 4.1;
- ни в коем случае не используйте одну и ту же посуду для раствора конъюгата и **SOLN|TMB**;
- не проводите визуальный учет результатов анализа (без использования ридера);
- дополнительное оборудование, находящееся в непосредственном контакте с биологическим материалом или компонентами набора, считается загрязненным и нуждается в очищении и обеззараживании;

- ИФА-набор предназначен для 96 анализов. Компоненты после использования и остатки неиспользованных компонентов должны быть утилизированы.

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для лабораторного профессионального применения в *in vitro* диагностике и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых неопудренных перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате проведения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- контроли ИФА-набора «EQUI anti-HBs» протестированы и признаны отрицательными на HBsAg и антитела к ВИЧ1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однако работать с контролями и исследуемым материалом необходимо как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- некоторые компоненты набора содержат низкие концентрации вредных веществ и могут спровоцировать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] и раствора конъюгата на слизистые оболочки или кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем насухо вытереть фильтровальной бумагой. В ином случае кислоту необходимо сначала нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

5.3. Инактивация и утилизация отходов

- жидкие отходы необходимо инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре стерилизации не меньше 132°C;
- не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- утилизацию инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством.

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

ИФА-набор стабилен в течение срока годности, указанного на этикетке, если его хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать набор при температуре 2-8°C. Допускается одноразовая транспортировка при температуре не выше 23°C в течение двух суток.

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

Кровь необходимо отбирать из вены в стерильную пробирку. Пробирка должна быть промаркирована с указанием идентификационных данных пациента и даты отбора образца. Цельную кровь до отделения сыворотки можно хранить до 24 часов при температуре 2-8°C, не допуская замораживания.

Сыворотку или плазму крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 3 суток. Допускается более продолжительное хранение замороженной сыворотки при температуре -20°C или -70°C. Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освобождаются от нерастворенных включений центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 минут. Не следует использовать образцы сывороток с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным проростом.

Образцы сывороток транспортировать в термоизоляционных контейнерах. Для этого закрытые промаркированные пробирки необходимо поместить в полиэтиленовый пакет, плотно запечатать и положить в центре термоконтейнера. Замороженные хладагенты положить на дно вдоль боковых стенок термоконтейнера и накрыть ими образцы сывороток.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Примечание: Перед использованием выдержите все компоненты ИФА-набора при комнатной температуре 18-25°C в течение 30 минут!

8.1. Подготовка планшета ИФА

Для предупреждения конденсации воды в лунках открывайте **STRIPS** только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Раскройте вакуумную упаковку, отделите необходимое количество лунок, а остальное сразу же тщательно упакуйте с влагопоглотителем и храните плотно закрытыми на замок zip-lock при температуре 2-8°C. Хранение упакованного таким образом планшета обеспечивает его стабильность в течение 6 месяцев.

8.2. Приготовление промывочного раствора

Для приготовления раствора для промывания разведите **TWEEN|WASH|20x** 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, потом перемешайте. Например, 5 ml концентрата + 95 ml воды, чего достаточно для 8 лунок. При наличии кристаллов в концентрате раствора для промывания прогрейте флакон при температуре 37°C до полного растворения кристаллов (15–20 минут). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток.

8.3. Приготовление раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата готовится следующим образом: разведите (фиолетовый) в чистом флаконе раствором (розовый) в соотношении 1:11 (то есть, 1+10), раствор окрашивается в фиолетовый цвет. Например, для 8 лунок анализа добавить до 300 µl 30 µl . Раствор конъюгата в рабочем разведении стабильный в течение суток при условии хранения при температуре 2-8°C.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (четыре лунки для контролей и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с контролями обязательно включайте в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполните схему внесения образцов.
- 9.3. Приготовьте раствор для промывания в соответствии с пунктом 8.2.
- 9.4. Приготовьте раствор конъюгата согласно пункту 8.3.
- 9.5. Внесите в лунки по 70 µl контролей и исследуемых образцов:
 – в лунку A1,
 – в лунки B1, C1, D1,
в остальные лунки – исследуемые образцы.
- 9.6. Внесите в лунки по 35 µl раствора конъюгата поверх контролей и исследуемых образцов. Для предотвращения кроссконтаминации образцов внесите раствор конъюгата, не касаясь содержания лунок. Осторожно постукивая по планшету, перемешайте смесь в лунках.
- 9.7. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 120 минут при температуре 37°C.
- 9.8. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;
 - аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;
 - повторите процедуру промывания еще пять раз;
 - после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.9. Внесите в лунки по 100 µl , не касаясь дна и стенок лунок планшета.
- 9.10. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.
- 9.11. Внесите в лунки стрипов по 100 µl для остановки ферментативной реакции, придерживаясь той же последовательности,

что и при внесении [SOLN|TMB]. Во время внесения происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором незначительно меняется оттенок.

9.12. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения измерения убедитесь в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае оставьте лунку для установления бланка (в такую лунку внесите только [SOLN|TMB] и [SOLN|STOP]).

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Рассчитать среднее значение ОП негативного контроля (\bar{Nc}) уровень граничного значения (Cut off - CO).

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \bar{Nc} + 0,2$$

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они соответствуют следующим требованиям:

CONTROL +

ОП $\geq 1,5$

CONTROL -

ОП $\leq 0,100$

CONTROL -

$\bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0$

где Ncn – ОП каждого повтора Nc

Если одно из значений ОП негативного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отбрасывают и рассчитывают \bar{Nc} по остальным значениям ОП негативного контроля. Если более одного значения ОП негативного контроля не отвечает указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного проведения.

10.3. Интерпретация результатов

OD_{sample} \geq CO ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ

OD_{sample} $<$ CO ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

, где OD_{sample} - ОП образца

Результаты для образцов, ОП которых равна граничному значению или находится в пределах $\pm 10\%$, следует интерпретировать осторожно. Такие образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках набора «EQUI anti-NBs». Если при повторном тестировании OD_{sample} снова находится в пределах $\pm 10\%$ от граничного значения, следует провести отбор и анализ нового образца.

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

Воспроизводимость результатов в пределах одной постановки анализа (Intra assay repeatability)

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с различной концентрацией anti-HBcore антител оценивали в 32 повторях на одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП _{ср}	mIU/ml (мМЕ/мл)	CV, %
103/10	1,654	95,9	3,4
104/24	0,389	16,7	5,1

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с различной концентрацией anti-HBcore антител оценивали в течение 3 дней в 3 постановках анализа, по 8 повторов в каждом анализе.

№ сыворотки	ОП _{ср}	mIU/ml (мМЕ/мл)	CV, %
103/10	1,812	102,9	9,9
104/24	0,389	16,8	9,1

Аналитическая специфичность

На результат анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,21 mg/ml (361,8 μmol/l), гемоглобина в концентрации до 10 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

11.2. Диагностические характеристики

Для определения клинической чувствительности ИФА-наборов «EQUI anti-HBs» использовали 19 образцов сывороток от вакцинированных пациентов и 8 положительных образцов с коммерческой панели сывороток производства SeraCare Life Sciences Inc (США). Клиническая чувствительность наборов «EQUI anti-HBs» составила 100%.

Исследование характеристик метода по сравнению с аналогичным коммерческим ИФА-набором проводили на целевой группе беременных женщин и выборке доноров (168 образцов). Для выборки беременных женщин и доноров относительная специфичность составила 99,3%, процент совпадения составляет 97,6%.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Положительный результат в ИФА-наборе «EQUI anti-HBs» является свидетельством наличия у пациента антител к поверхностному антигену вируса гепатита В. Антитела к HBsAg являются показателем протективного

иммунитета.

Отрицательный результат в ИФА-наборе «EQUI anti-HBs» показывает, что тестируемый образец не содержит анти-HBs антител или их концентрация ниже уровня чувствительности анализа.

Выявление анти-HBs у пациента не является доказательством наличия вируса гепатита В в организме, эти антитела обнаруживаются при хроническом и перенесенном в анамнезе гепатите В, а также у вакцинированных против гепатита В лиц. Чтобы отличить эти состояния, рекомендуется протестировать пациента на другие маркеры гепатита В и исследовать образец на наличие HBsAg и специфических антител классов IgM и IgG к HBcore антигена (например, в ИФА-наборах «EQUI HBsAg», «EQUI HBcore IgM» и «EQUI HBcore IgG», соответственно).

Для оценки уровня протективного иммунитета рекомендуется определить концентрацию анти-HBs антител в образце с применением комплекта калибраторов «EQUI anti-HBs Calibrators».

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Высокий фон в лунках всего планшета может возникнуть из-за:

- загрязненного промывателя;
- низкого качества или загрязнения воды;
- использования плохо помытой посуды;
- использования дезинфицирующих средств, содержащих хлор;
- использования загрязненных наконечников;
- увеличения времени инкубации или изменения температурного режима.

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

- повторным внесением раствора ТМБ;
- загрязнением конуса автоматической пипетки раствором конъюгата;
- загрязнением одного из каналов промывателя.

Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

- неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (раствор конъюгата или раствор ТМБ);
- сокращено время инкубации на одном из этапов.

Интенсивность окрашивания лунок не соответствует полученной оптической плотности. Это может свидетельствовать о смещенном оптическом луче.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mahoney F.J. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection // *Clinical Microbiology Review* – 1999. – Vol.12, N 2 - P.351–366.
2. Maddrey W.C. Hepatitis B - an important public health issue // *Clin. Lab.* - 2001. - Vol. 47, N 1-2. - P.51-55.
3. Spradling P.R., Xing J., Williams R. et al. Immunity to Hepatitis B Virus (HBV) Infection Two Decades after Implementation of Universal Infant HBV Vaccination: Association of Detectable Residual Antibodies and Response to a Single HBV Challenge Dose // *Clinical and Vaccine Immunology.* - 2013. - Vol.20, N 4. - P.559–561.
4. Walsh K., Alexander G.J.M. Update on chronic viral hepatitis // *Postgraduate Medical Journal* - 2001. - V. 77. - P. 498-505.
5. Возіанова Ж.І. Вірусний гепатит В // *Інфекційні та паразитарні хвороби: В 3 т. – К.:»Здоров'я», 2001. т.1. – С.601-614.*
6. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Systematic review on hepatitis B and C prevalence in the EU/EEA. Stockholm: 2016.
7. CDC Hepatitis B Information // <https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/index.htm>.
8. World Health Organization (WHO). WHO guidelines on hepatitis B and C testing. Geneva: World Health Organization; 2017 // <http://www.who.int/hepatitis/publications/guidelines-hepatitis-c-b-testing/en/>.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України.* - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Производитель



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Дата изготовления



Использовать до



Код партии



Температурное ограничение



Содержит достаточно для (n-) испытаний



Предостережение, ознакомьтесь с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 7 от 18.10.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквигестлаб»

ул. Большая Васильковская 114, г. Киев, Украина, 03150

проспект Победы 60/2, г. Киев, Украина, 03057 (адрес производства)

тел.: 0 (800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,

e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

Внести по 70 µl контролей и исследуемых образцов в лунки:
A1 – [CONTROL+], B1, C1, D1 – [CONTROL-],
E1 и в остальные лунки - исследуемые образцы

Внести по 35 µl приготовленного 1:11 (1+10) раствора конъюгата

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **120 min при температуре 37°C**

Промыть лунки 6 раз приготовленным 1:20 (1+19) раствором для промывания TWEEN (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|TMB]

Инкубировать на протяжении **30 min в темноте при температуре 18-25°C**

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|STOP]
(происходит изменение цвета с голубого на желтый)

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = \bar{Nc} + 0,2;$$

\bar{Nc} - Среднее значение ОП 3-х [CONTROL-]

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

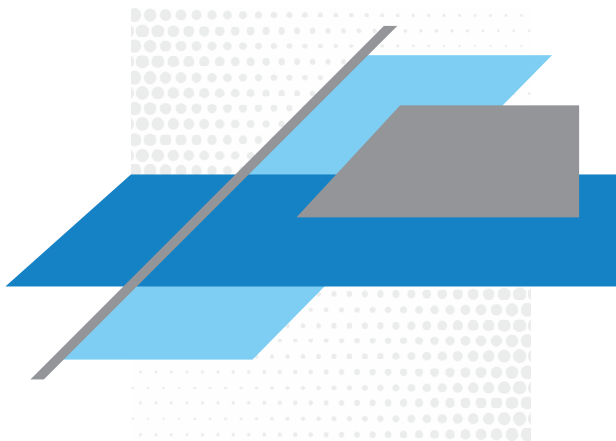
$OD_{\text{sample}} \geq CO$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$OD_{\text{sample}} < CO$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



anti-HCV

ИФА-набор для качественного определения
суммарных антител к вирусу гепатита С

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-021

Σ 96
анализов


UA.TR.061

EQUI anti-HCV

ИФА-набор для качественного определения суммарных антител к вирусу гепатита С

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ИФА-набор «EQUI anti-HCV» предназначен для качественного определения суммарных антител к вирусу гепатита С (ВГС) в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики гепатита С и скрининга донорской крови. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и для автоматического иммуноферментного анализатора «открытого» типа.

Целевая группа: доноры; лица-потребители инъекционных наркотиков; реципиенты крови или органов; беременные женщины; дети, рожденные от инфицированных матерей; лица, инфицированные ВИЧ; пациенты с симптомами заболеваний печени.

Применение: ИФА-набор применяется в клинических диагностических лабораториях, станциях переливания крови, а также в других учреждениях, работающих в области *in vitro* диагностики.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Гепатит С – это вирусное поражение печени. Вирус гепатита С (ВГС) вызывает острую инфекцию, которая может перейти в хроническую форму. Вирус гепатита С относится к семейству *Flaviviridae*. Вирионы маленькие (50-60 nm), сферические, покрытые оболочкой. Генетический материал вируса представлен одноцепочечной РНК. Передача вируса происходит гемотрансмиссивным путем, для заражения здорового организма достаточно небольшого количества крови, содержащей ВГС. Инкубационный период гепатита С может длиться от двух недель до полугода.

В связи с бессимптомным течением гепатит С редко выявляют на ранних стадиях. По рекомендациям международных организаций в сфере здравоохранения (ВОЗ, CDC) диагностика инфекции ВГС проводится в два этапа. Сначала проводится серологический скрининг на антитела к вирусу гепатита С. Затем для положительных образцов необходимо подтвердить наличие хронической гепатитной инфекции обнаружением РНК вируса. Антитела к ВГС при отсутствии генетического материала вируса не могут свидетельствовать об активной инфекции у пациента. После диагностирования гепатитной инфекции оценивают степень поражения печени (фиброза, цирроза), проводят дополнительные лабораторные тесты для назначения лечения и мониторинга его эффективности.

«Серологическое окно» и характер иммунного ответа после инфицирования могут сильно отличаться у разных пациентов. Первыми в крови инфицированных оказываются РНК и Core-антиген вируса (через 1-3 недели). ВГС-специфические антитела IgM класса обнаруживаются через 1-2 месяца после инфицирования. У 50-90% пациентов с острой гепатитной

инфекцией они могут определяться в высоких титрах несколько месяцев. Впоследствии, у 50-70% лиц, больных хроническим гепатитом С, IgM антитела обнаруживаются на невысоких уровнях, особенно при обострении инфекционного процесса. После эффективной терапии ВГС-специфические IgM антитела исчезают через несколько месяцев. Этот маркер важен для мониторинга лечения, но не является информативным для скрининга гепатита С. Продуцирование антител ВГС на относительно низком уровне во время острой фазы начинается почти одновременно с антителами класса IgM, но постепенно возрастает при хронизации инфекции. IgG антитела к ВГС производятся на высоких уровнях во время хронического гепатита С и могут проявляться даже после выведения вируса из организма.

При производстве иммуноферментных тестов третьего поколения для диагностики гепатита С используются рекомбинантные антигены ВГС, аналоги белков Core, NS3, NS4 и NS5. Чувствительность таких тестов достигает 99%, а специфичность приближается к 100%. Однако, чувствительность и специфичность ИФА тестов разных производителей могут несколько отличаться. Ложноотрицательные анализы встречаются у иммуносупрессированных лиц, а ложноположительные результаты могут быть связаны со способом получения рекомбинантных белков. Результаты обнаружения антител к ВГС необходимо подтверждать другими лабораторными методами.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Определение антител, специфичных к ВГС, в ИФА-наборе «EQUI anti-HCV» базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы рекомбинантные антигены вируса гепатита С: core, NS3, NS4 та NS5. При первом этапе инкубации исследуемых образцов в лунках планшета ИФА специфические к ВГС антитела, если они присутствуют в образцах, связываются с соответствующими антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется смесь конъюгатов антивидовых (анти-IgG и анти-IgM) моноклональные антитела с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются при отмывании. Комплексы антиген-антитело обнаруживаются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620–695 нм. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

Планшет ИФА

STRIPS 1 x 96 лунок
В лунках планшета засорбированы рекомбинантные антигены ВГС: core, NS3, NS4 та NS5. Лунки можно отделять. После первого вскрытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не более 6 месяцев

CONTROL + 1 x 0,6 ml
Позитивный контроль
Раствор иммуноглобулинов человека, специфичных к ВГС, с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C

CONTROL - 1 x 1,6 ml
Негативный контроль
Негативная сыворотка крови человека с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C

DIL|SAMPLE 1 x 11 ml
Раствор для разведения сывороток
Буферный раствор с экстрактом молока, детергентом и консервантом (коричневый). Хранить при температуре 2-8°C

SOLN|CONJ 1 x 13 ml
Раствор конъюгата (готов к использованию)
Буферный раствор моноклональных антител к IgG и IgM человека, конъюгированный с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зеленый). Хранить при температуре 2-8°C

SOLN|TMB 1 x 13 ml
Раствор ТМБ (готов к использованию)
Раствор ТМБ, H₂O₂, стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

TRITON|WASH|20x 1 x 50 ml
Раствор для промывки TRITON (20x концентрат)
20-кратный концентрат фосфатного буфера с Тритоном X-100 (бесцветный). Развести раствор для промывки TRITON (20x) 1:20 дистиллированной или деионизированной водой (например, 5 ml концентрата + 95 ml воды для 8 лунок) перед использованием. Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток

SOLN|STOP 1 x 13 ml
Стоп-раствор (готов к использованию)
Раствор 0,5 mol H₂SO₄ (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

В состав набора входят: клейкая пленка (2 шт.), схема внесения образцов (1 шт.), лист контрольных испытаний и инструкция по применению.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники к ним, мерная лабораторная посуда (10–1000 ml), деионизированная или дистиллированная вода, термостат на 37°C, автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер), спектрофотометр (ридер) для микропланшетов 450/620-695 nm, соответствующие контейнеры

для отходов потенциально зараженного материала, таймер, фильтровальная бумага, одноразовые неопудренные перчатки, дезинфицирующие средства.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

Перед проведением анализа внимательно ознакомьтесь с инструкцией по применению. Достоверность результата зависит от четкого следования процедуре анализа.

- не используйте компоненты ИФА-набора по истечении срока годности;
- не используйте при анализе и не смешивайте компоненты различных серий, компоненты из наборов различных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с набором «EQUI anti-HCV»;
- не замораживайте ИФА-набор или его компоненты;
- после использования реагента закрывайте каждый флакон своей крышкой;
- во время промывки контролируйте наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз используйте новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегайте попадания прямых солнечных лучей на реагенты ИФА-набора;
- **SOLN|TMB** должно быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегайте контакта **SOLN|TMB** с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно выполосканную дистиллированной водой посуду;
- не используйте реагенты, цвет которых не соответствует указанному в пункте 4.1;
- ни в коем случае не используйте одну и ту же посуду для **SOLN|CONJ** и **SOLN|TMB**;
- не проводите визуальный учет результатов анализа (без использования ридера);
- дополнительное оборудование, находящееся в непосредственном контакте с биологическим материалом или компонентами набора, считается загрязненным и требует очистки и обеззараживания;
- ИФА набор предназначен для 96 анализов. Компоненты после использования и остатки неиспользованных компонентов должны быть утилизированы.

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для профессионального лабораторного применения в *in vitro* диагностике и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых неопудренных перчатках и защитных очках;

- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате проведения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- [CONTROL+] ИФА-набора «EQUI anti-HCV» содержит иммуноглобулины человека, специфические к ВГС, которые были выделены с инаktivированным прогреванием сывороток крови человека, в которых не было обнаружено HBsAg и антител к ВПЛ1/2 и *Treponema pallidum*, однако работать с контролем следует как с потенциально инфекционным материалом;
- [CONTROL-] ИФА-набора «EQUI anti-HCV» протестировано и признано отрицательным на HBsAg и антитела к ВПЛ1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однако обращаться с контролем и изучаемыми образцами следует как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- некоторые компоненты набора содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых. При попадании [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] и [SOLN|CONJ] на слизистые или кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, затем вытереть досуха фильтровальной бумагой. В противном случае кислоту сначала нужно нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

5.3. Инаktivация и утилизация отходов

- жидкие отходы следует инаktivировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инаktivировать путем автоклавирования при температуре стерилизации не менее 132°C;
- не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- утилизацию инаktivированных отходов проводить согласно действующему национальному законодательству.

6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

ИФА набор стабильный в течение срока годности, указанного на этикетке, если его хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать набор при температуре 2-8°C. Допускается одноразовая транспортировка при температуре не выше 23°C в течение двух суток.

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

Кровь необходимо собирать из вены в стерильную пробирку. Пробирка должна быть промаркирована с указанием идентификационных данных пациента и дать забор образца. Цельную кровь до отделения сыворотки можно хранить до 24 часов при температуре 2-8°C, не допуская замораживания.

Сыворотку или плазму можно хранить при температуре 2-8°C в пределах 3 суток. Допускается более длительное хранение замороженной сыворотки при температуре -20°C или -70°C. Перед использованием замороженные образцы следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторной заморозки-оттаивания исследуемых образцов. При помутнении сыворотки (или плазмы) освобождаются от нерастворимых включений центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 минут. Не следует использовать образцы сывороток с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным проростом.

Образцы сывороток транспортировать в термоизоляционных контейнерах. Для этого закрытые промаркированные пробирки необходимо поместить в полиэтиленовый пакет, закрыть плотно и положить в центре термоконтейнера. Замороженные хладагенты положить на дно вдоль боковых стен термоконтейнера и покрыть ими образцы сывороток.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Примечание: Перед использованием выдержите все компоненты набора ИФА при комнатной температуре 18-25°C в течение 30 минут!

8.1. Подготовка планшета ИФА

Для предотвращения конденсации воды в лунках открывайте **STRIPS** только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Раскройте вакуумную упаковку, отделите необходимое количество лунок, а остальные сразу же тщательно упакуйте с влагопоглотителем и храните плотно закрытыми на замок zip-lock при температуре 2-8°C. Хранение таким образом упакованного планшета обеспечивает его стабильность в течение 6 месяцев.

8.2. Приготовление промывочного раствора

Для приготовления промывочного раствора разведите 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, затем перемешайте. Например, 5 мл концентрата + 95 мл воды, что достаточно для 8 лунок. При наличии кристаллов в концентрате промывочного раствора прогрейте флакон при температуре 37°C до полного растворения кристаллов (15–20 минут). Разбавленный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (четыре лунки для контроля и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с контролями обязательно включайте в каждую постановку анализа.

9.2. Заполните схему внесения образцов.

9.3. Приготовьте раствор для промывания согласно пункту 8.2.

9.4. Внесите во все лунки планшета по 80 µl [DIL|SAMPLE].

9.5. Внесите в лунки по 40 µl контролей и исследуемых образцов:

[CONTROL|+] – в лунку A1,

[CONTROL|-] – в лунки B1, C1, D1,

в остальные лунки – исследуемые образцы.

При внесении происходит изменение цвета раствора с коричневого на синий.

Осторожно пипетируйте смесь в лунках, не допуская пенообразования.

9.6. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 60 минут при температуре 37°C.

9.7. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:

– удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;

– наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывки, оставьте не менее 30 секунд;

– аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должно составлять не более 5 µl;

– повторите процедуру промывки еще четыре раза;

– после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

9.8. Внесите в лунки по 100 µl [SOLN|CONJ]. Стрипы накройте новой клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.

9.9. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.

9.10. Внесите в лунки по 100 µl [SOLN|TMB], не касаясь дна и стенок лунок планшета.

9.11. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.

9.12. Внесите в лунки стрипов по 100 µl [SOLN|STOP] для остановки ферментативной реакции, соблюдая ту же последовательность, что и при внесении [SOLN|TMB]. При внесении происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором несколько меняется оттенок.

9.13. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения

измерения убедитесь в чистоте наружной поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае оставьте лунку для установки бланка (в такую лунку внесите только [SOLN|TMB] и [SOLN|STOP]).

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Рассчитайте среднее значение ОП негативного контроля (\bar{Nc}) и уровень граничного значения (Cut off - CO).

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \bar{Nc} + 0,25$$

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

$$[CONTROL +] \quad ОП \geq 1,5$$

$$[CONTROL -] \quad ОП \leq 0,100$$

$$[CONTROL -] \quad \bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0 \quad \text{где } Ncn - ОП \text{ каждого повтора } Nc$$

Если одно из значений ОП негативного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отбрасывают и рассчитывают \bar{Nc} по остальным значениям ОП негативного контроля. Если более одного значения ОП негативного контроля не соответствует указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного выполнения.

10.3. Интерпретация результатов

$$\begin{array}{lll} OD_{sample} \geq CO & \text{ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ*} & , \text{ где } OD_{sample} - \\ OD_{sample} < CO & \text{ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ} & \text{ОП образца} \end{array}$$

* Первоначально положительные образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках набора ИФА «EQUI anti-HCV». После повторного тестирования положительными считаются образцы, оптическая плотность которых хотя бы в одном из повторов превышает предельное значение. Согласно рекомендациям ВОЗ, для диагностики гепатита С образцы, интерпретированные как положительные, должны быть дополнительно проверены на наличие РНК вируса гепатита С. Положительный результат на анти-ВГС антитела при отсутствии РНК вируса не может свидетельствовать об активной гепатитной инфекции. Если при повторном тестировании оптическая плотность образца в обоих повторах ниже граничного значения, такой образец считать отрицательным.

Результаты для образцов, ОП которых равно граничному значению или находится в пределах $\pm 10\%$, следует интерпретировать осторожно. Такие образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках набора «EQUI Редакция 7 от 11.10.2021г.

anti-HCV». Если при повторном тестировании OD_{sample} снова находится в пределах $\pm 10\%$ от граничного значения следует провести отбор и анализ нового образца.

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Аналитические характеристики

Прецизионность

Повторяемость результатов в рамках одной постановки анализа (Intra assay repeatability)

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в 32 повторях на одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП _{ср}	CV, %
973/300	1,422	6,9
704/500	1,845	5,0

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в течение 4 дней в 4 постановках анализа, по 8 повторов в каждом анализе.

№ сыворотки	ОП _{ср}	CV, %
973/300	1,500	8,6
704/500	1,912	8,5

Аналитическая специфичность

На результат анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,1 mg/ml (172,3 $\mu\text{mol/l}$), гемоглобина в концентрации до 5 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

11.2. Диагностические характеристики

Для определения клинической чувствительности и специфичности ИФА-наборов «EQUI anti-HCV» использовали 67 образцов сывороток от пациентов с диагнозом ВГС и 300 образцов сывороток клинически здоровых доноров. Кроме того, были использованы коммерческие панели охарактеризованных образцов производства SeraCare Life Sciences Inc., а также стандартная панель «Стандарт АТ(+/-)ВГС-МБА» производства ООО «Медбиоальянс». Клиническая чувствительность ИФА-наборов «EQUI anti-HCV» составила 100%, клиническая специфичность – 99,7%.

Исследование характеристик метода по сравнению с аналогичным коммерческим ИФА-набором проводилось на целевой группе беременных женщин (169 образцов). Для этой выборки относительная специфичность набора «EQUI anti-HCV» составляла 100%, процент совпадения - 98,2%.

Положительная прогностическая ценность (PPV) ИФА-набора «EQUI anti-HCV» составляет 99,1%, отрицательная прогностическая ценность (NPV) – 100%.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Интерпретация результатов должна проводиться с учетом клинических проявлений и данных комплекса лабораторных исследований. Для диагностики острого, хронического или перенесенного гепатита С, оценки эффективности терапии рекомендуется дополнительно провести исследование образца на наличие РНК ВГС, антител к отдельным белкам ВГС и анти-ВГС IgM антител (например, в ИФА-наборах «EQUI anti-HCV Different» и «EQUI HCV IgM», соответственно), и оценить биохимические показатели сыворотки крови.

Современные методы выявления антител к ВГС не могут обеспечить выявления всех инфицированных пациентов. Негативный результат не исключает инфицирование вирусом гепатита С пациента, особенно если он проходит иммуносупрессивное лечение или инфицированный ВИЧ, а также на ранних стадиях гепатитной инфекции.

Любой из методов ИФА может допустить ложноположительную реакцию. Для исключения ложноположительных результатов рекомендуется провести верификационное исследование с определением РНК вируса гепатита С или антител к отдельным ВГС белкам.

13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Высокий фон в лунках всего планшета может возникнуть из-за:

- загрязненного промывателя;
- низкого качества или загрязнения воды;
- использования плохо помытой посуды;
- использования дезинфицирующих средств, содержащих хлор;
- использования загрязненных наконечников;
- увеличения времени инкубации или изменения температурного режима.

Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:

- повторным внесением раствора ТМБ;
- загрязнением конуса автоматической пипетки раствором конъюгата;
- загрязнением одного из каналов промывателя.













Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:

- неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (раствор конъюгата или раствор ТМБ);
- сокращено время инкубации на одном из этапов.

Интенсивность окрашивания лунок не соответствует полученной оптической плотности. Это может свидетельствовать о смещенном оптическом луче.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brillanti S., Masci C., Miglioli M. and Barbara L. Serum IgM antibodies to hepatitis C virus in acute and chronic hepatitis C. // Archives of virology. Supplementum. - 1993. – N8. – P.213-218.
2. Casino C., Lilli D., Rivanera D., et. al. Diagnostic value of anti-hepatitis C virus (HCV) core immunoglobulin M in recurrence of HCV infection after orthotropic liver transplantation. // Journal of Clinical Microbiology. - 1999. – Vol.37, N.8. – P.2726-2728.
3. CDC Testing Recommendations for Hepatitis C Virus Infection, 2015 // <https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/guidelinesc.htm>.
4. Dal Molin G., Tiribelli C. Campello C. A rational use of laboratory tests in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. // Annals of hepatology. - 2003. – Vol.2. – P.76-83.
5. Gupta E., Bajpai M. and Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays // Asian Journal of Transfusion Science. - 2014. - Vol.8. - P.19-25.
6. Lefrere J.J., Guiramand S., et al. Full or partial seroreversion in patients infected by hepatitis C virus // Journal of Infectious Diseases. - 1997. - Vol.175. - P.316–322.
7. Richter S. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. // Journal of Clinical Microbiology. - 2002. – Vol.40. – N.12. – P.4407-4412.
8. Urdea M.S., Wuestehube L.J., Laurenson P.M., and Wilber J.C. Hepatitis C – diagnosis and monitoring. // Clinical Chemistry. - 1997. – V.43. – N.8. – P.1507-1511.
9. WHO Global Hepatitis Report, 2017 // <http://www.who.int/hepatitis/publications/globalhepatitis-report2017/en/>
10. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
11. Закон України «Про відходи» // Відомості Верховної Ради України. - 1998. - №36-37.
12. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
13. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
14. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
15. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.

	Производитель
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Номер по каталогу
	Дата изготовления
	Использовать до
	Код партии
	Температурное ограничение
	Содержит достаточно для (n-) испытаний
	Предостережение, ознакомьтесь с сопроводительными документами
	Ознакомление с инструкцией по применению
	Беречь от прямых солнечных лучей
	Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 7 от 11.10.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО «Эквипестлаб»
ул. Большая Васильковская 114, г. Киев, Украина, 03150

проспект Победы 60/2, г. Киев, Украина, 03057
(адрес производства)

тел.: 0 (800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,
e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25 °C

В лунки планшета внести по 80 µl [DIL|SAMPLE]
(коричневый цвет)

Внести по 40 µl контролей и исследуемых образцов в лунки:
A1 – [CONTROL|+], B1, C1, D1 – [CONTROL|-],
E1 и в остальные лунки - исследуемые образцы
(происходит изменение цвета с коричневого на синий)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **60 min при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) раствором для промывания TRITON (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|CONJ]
(зеленый цвет)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **30 min при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) раствором для промывания TRITON (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|TMB]

Инкубировать в течение **30 min в темноте при температуре 18-25°C**

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|STOP]
(происходит изменение цвета с голубого на желтый)

Измерить оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при 450/620-695 nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = Nc + 0,25;$$

\bar{Nc} - Среднее значение ОП 3-х [CONTROL|-]

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$OD_{sample} \geq CO$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$OD_{sample} < CO$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ