



REF	B-1154		96
REF	B-1152		192
REF	B-1155		480
REF	B-1156		48 (для подтверждения)

**ИНСТРУКЦИЯ
по применению**

**Набор реагентов
«ДС-ИФА-HBsAg»**

**Тест-система иммуноферментная для выявления или подтверждения
поверхностного антигена вируса гепатита В**

Содержание

I. НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
II. ПРИНЦИП ТЕСТА.....	3
III. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	7
VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ	8
VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ.....	9
VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ	9
IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ.....	9
X. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	11
XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ	14
XII. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА.....	15
XIII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ.....	15
XIV. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА.....	17
XV. ОБЪЯСНЕНИЕ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СИМВОЛОВ.....	17
Приложение	18

Набор реагентов выпускается в четырех комплектах:

Комплекты 1, 2, 3 – для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В:

Комплект 1 рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен как для ручной постановки, так и для постановки на ИФА-анализаторах открытого типа с возможностью дробного использования.

Комплект 2 рассчитан на проведение 192 (два разборных планшета) определений, включая контрольные, предназначен как для ручной постановки с возможностью дробного использования, так и для одновременной постановки на ИФА-анализаторах открытого типа.

Комплект 3 рассчитан на проведение 480 (пять разборных планшетов) определений, включая контрольные, предназначен как для ручной постановки с возможностью дробного использования, так и для одновременной постановки на ИФА-анализаторах открытого типа.

Комплект 4 – для подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В, рассчитан на проведение 48 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен как для ручной постановки, так и для постановки на ИФА-анализаторах открытого типа с возможностью дробного использования (по два стрипа).

I. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов «ДС-ИФА-НВsAg» Тест-система иммуноферментная для выявления или подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В» предназначен для выявления или подтверждения НВsAg в образцах сыворотки (плазмы) крови человека, препаратах, приготовленных из крови человека (альбумине, интерфероне лейкоцитарном). Возможно выявление или подтверждение, как диких типов, так и мутантных вариантов поверхностного антигена вируса гепатита В.

Вирусный гепатит В – повсеместно распространенное инфекционное заболевание, вызываемое одноименным вирусом (HBV). НВsAg – основной серологический маркер HBV-инфекции. Область применения тест-системы «ДС-ИФА-НВsAg» – клиническая лабораторная диагностика HBV-инфекции, скрининг донорской крови.

II. ПРИНЦИП ТЕСТА

Принцип действия набора реагентов «ДС-ИФА-НВsAg» основан на твердофазном ИФА (одностадийный «сэндвич»-вариант). НВsAg в исследуемом образце одновременно связывается с антителами к НВsAg, сорбированными в лунках планшета, и с антителами к НВsAg, мечеными пероксидазой хрена, в конъюгате. Не связавшиеся реагенты удаляются в ходе промывки. Далее добавляется субстратная смесь на основе ТМБ. Реакция останавливается добавлением серной кислоты. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации НВsAg в исследуемом образце.

Подтверждение наличия HBsAg в образце основано на реакции нейтрализации. К исследуемому образцу добавляется нейтрализующий реагент, содержащий поликлональные антитела к HBsAg, которые связывают HBsAg и делают невозможным образование комплекса HBsAg с антителами в составе иммуносорбента и конъюгата.

III. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

3.1. Состав набора:

Таблица 1

Характеристики реагентов		Форма выпуска			
		Комплект 1	Комплект 2	Комплект 3	Комплект 4
Иммуносорбент	Планшет полистироловый 96-луночный разборный до стрипов (или до лунок), в лунках которого сорбированы антитела к HBsAg (анти-HBs).	1 планшет	2 планшета	5 планшето	1 планшет
Конъюгат	Концентрат (×11). Анти-HBs, меченные пероксидазой хрена. Прозрачная или опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 1,2 мл	1 флакон 1,2 мл	1 флакон 3,6 мл или 3 флакона по 1,2 мл	1 флакон 1,2 мл
РРК	Раствор для разведения Конъюгата. Опалесцирующая голубого цвета жидкость, допустимо образование осадка, растворяющегося при встряхивании. Содержит 0,2% ProClin 300.	1 флакон 12,0 мл	1 флакон 12,0 мл	3 флакона по 12,0 мл или 2 флакона по 18,0 мл	1 флакон 12,0 мл
К+1	Контрольный положительный образец, инактивированный, содержащий HBsAg. Прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл
К+2	Контрольный слабоположительный образец, инактивированный, содержащий HBsAg с концентрацией $0,150 \pm 0,05$ МЕ/мл. Лиофилизированный. Сухая пористая аморфная белого или светло-жёлтого цвета масса. или Жидкий, готовый к применению. Прозрачная или опалесцирующая оранжевого цвета жидкость.	1 флакон или 1 флакон 2,5 мл	2 флакона или 1 флакон 2,5 мл	5 флаконов или 1 флакон 2,5 мл	-
К-	Контрольный отрицательный образец, инактивированный. Прозрачная или опалесцирующая зелёного цвета жидкость.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	2 флакона по 2,5 мл или 1 флакон 5,0 мл	1 флакон 2,5 мл

Инструкция по применению «ДС-ИФА-HBsAg»

ПР	Промывочный раствор. Концентрат (×25) фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т). Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость. Допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании.	1 флакон 50,0 мл или 1 флакон 120,0 мл	2 флакона по 50,0 мл или 1 флакон 120,0 мл	4 флакона по 50,0 мл или 2 флакона по 120,0 мл	1 флакон 50,0 мл или 1 флакон 120,0 мл
Стоп-реагент	Раствор серной кислоты (0,2М). Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон	2 флакона по 25,0 мл или 1 флакон	4 флакона по 25,0 мл или 2 флакона	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон
ТМБ-Субстратный раствор	ТМБ-Субстратный раствор. Прозрачная бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 14,0 мл или 1 флакон 25,0 мл	2 флакона по 14,0 мл или 1 флакон 25,0 мл	5 флаконов по 14,0 мл или 3 флакона по 25,0 мл или 1 флакон 60,0 мл	1 флакон 14,0 мл
или		или	или	или	или
СБ	Субстратный буферный раствор – цитратный буфер, содержащий раствор перекиси водорода. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	3 флакона по 25,0 мл или 2 флакона по 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл
и					
ТМБ	Концентрат (×11). Раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Прозрачная бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	3 флакона по 2,5 мл или 2 флакона по 3,5 мл	1 флакон 2,5 мл
АНТИ-HBs-ПЛЮС	Нейтрализующий реагент, инактивированный. Прозрачная розового цвета жидкость.	-	-	-	1 флакон 2,0 мл
АНТИ-HBs-МИНУС	Контрольный реагент, инактивированный. Прозрачная голубого цвета жидкость.	-	-	-	1 флакон 2,0 мл

Набор комплектуется готовыми реагентами и концентрированными растворами. Имеется маркировка посредством штрих-кодов, а также цветовая кодировка для ряда реагентов. Цветовая кодировка реагентов – условное обозначение цвета/окраски жидких реагентов. К+1 – красный; К+2 (жидкий) – оранжевый; К- – зелёный.

Реагенты набора помещают в потребительскую упаковку (коробку фасовочную). Каждая упаковка снабжена инструкцией по применению.

3.2. Принадлежности:

- плёнки защитные для ИФА-планшетов: комплект 1 (1 шт.), комплект 2 (2 шт.), комплект 3 (5 шт.), комплект 4 (1 шт.);
- наконечники одноразовые: комплект 1 (16 шт.), комплект 2 (32 шт.), комплект 3 (80 шт.), комплект 4 (16 шт.);
- ванночки пластиковые для жидких реагентов: комплект 1 (2 шт.), комплект 2 (4 шт.), комплект 3 (10 шт.), комплект 4 (2 шт.);
- пакеты полиэтиленовые с замком Zip-Lock: комплект 1 (1 шт.), комплект 2 (2 шт.), комплект 3 (3 шт.), комплект 4 (1 шт.).

3.3. В комплект поставки входят: набор реагентов (дополнительно может быть укомплектован принадлежностями), инструкция по применению, паспорт.

IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. **Аналитическая чувствительность** оценивалась с использованием международных стандартов:

- Second International Standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A (NIBSC code: 00/588).
- Third International Standard for HBsAg HBV genotype B4, HBsAg subtypes ayw1/adw2 (NIBSC code: 12/226).

Уровень чувствительности тест-системы при детекции поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) составляет: 0,1 МЕ/мл (термостат); 0,05 МЕ/мл (термошейкер); 0,01 МЕ/мл (термостат (37 ± 1,0) °C, 18 часов).

Чувствительность набора реагентов при выявлении поверхностного антигена вируса гепатита В:

- в альбумине – 1,0 МЕ/мл (термостат); 0,5 МЕ/мл (термошейкер);
- в интерфероне лейкоцитарном – 0,5 МЕ/мл (термостат); 0,25 МЕ/мл (термошейкер).

4.2. **Диагностическая чувствительность** оценивалась при исследовании:

- 453 образцов сыворотки (плазмы) крови пациентов с острым и хроническим гепатитом В и составила 100% (95%CI: (99,2-100%).
- 11 коммерческих сероконверсионных панелей (ВВІ и ZeptoMetrix, США). Из 176 образцов сероконверсионных панелей «ДС-ИФА-HBsAg» выявил как позитивные 53 образца. Набор реагентов «ДС-ИФА-HBsAg» выявил HBV инфекцию в среднем через 70,45 дней после первой кроводачи (для данного набора панелей).
- Панели HBsAg native mutants in CDP Plasma (Trina Code: DH1200, Trina Bioreactives AG). Из 48 образцов панели выявлено 47.

4.3. **Специфичность** оценивалась при исследовании:

- 5010 образцов сыворотки (плазмы) крови доноров случайной выборки. Специфичность составила 99,9% (95%CI: (99,82-99,98%).
- 770 образцов сыворотки (плазмы) крови человека от клинических пациентов с гепатитом С. Специфичность составила 99,6% (95%CI: (98,86-99,87%).

- 246 образцов сыворотки (плазмы) крови беременных женщин. Специфичность составила 99,6% (95%CI: (97,73-99,93%).
- 194 образцов сыворотки (плазмы) крови от клинических пациентов с различными неинфекционными заболеваниями. Специфичность составила 99,5% (95%CI: (97,14-99, 91%).
- 50 образцов препаратов крови человека:
 - 35 образцов альбумина. Специфичность составила 100% (95%CI: (90,11-100%);
 - 15 образцов интерферона лейкоцитарного. Специфичность составила 100% (95%CI: (79,61-100%).

Если процедура получения и подготовки образцов для исследования не соответствует требованиям, изложенным в п.VIII настоящей инструкции, показатели специфичности могут отличаться от указанных.

4.4. Воспроизводимость

Воспроизводимость оценена с использованием 3 положительных образцов внутри планшета и между планшетами на трёх сериях набора реагентов. Коэффициенты вариации не превысили 10%.

Для оценки вариабельности теста было протестировано 3 образца сыворотки крови человека с высоким, средним и низким содержанием НВsAg.

Для оценки внутрипланшетной воспроизводимости эти образцы были протестированы 25 раз в одной постановке «ДС-ИФА-НВsAg». Коэффициент вариации не превышал 7%.

Для оценки межпланшетной воспроизводимости эти образцы были протестированы в дубликатах в течение 3 дней двумя разными операторами. Коэффициент вариации не превышал 10%.

Для анализа рисков получения ложноотрицательных результатов при повторном тестировании слабоположительных образцов проведено многократное исследование 3 образцов с ОП близкой к ОПкрит. С вероятностью 85,8% можно ожидать, что образцы с ОП $\pm 20\%$ от ОПкрит. будут давать постоянный результат при тестировании в «ДС-ИФА-НВsAg».

4.5. Эквивалентность образцов сыворотки и плазмы крови человека

Дополнительными исследованиями коллекции положительных (n=25) и отрицательных (n=25) парных образцов сыворотки и плазмы была показана их эквивалентность, что позволяет отнести показатели диагностической чувствительности и специфичности к обоим видам исследуемых образцов.

V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Нестерильное медицинское изделие для диагностики *in vitro*. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ Минздрава России от 06.06.2012 г. N 4н).

5.2. Набор предназначен для профессионального использования в клинической лабораторной диагностике специально обученным персоналом. При работе с набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования к безопасности».

- 5.3. Реагенты набора не содержат вредных веществ в опасных концентрациях, за исключением реагентов, обозначенных символом «Внимание». При их попадании на кожу или слизистые немедленно промыть большим количеством воды.
- 5.4. Контрольные образцы К+1, К+2, приготовлены с использованием инактивированной сыворотки (плазмы) крови человека, не содержащей антиген р24 ВИЧ-1, антитела к HCV и ВИЧ-1,2; содержат HBsAg.
- 5.5. Контрольные образцы К-, АНТИ-HBs-ПЛЮС и АНТИ-HBs-МИНУС приготовлены с использованием инактивированной сыворотки (плазмы) крови человека, не содержащей HBsAg, антиген р24 ВИЧ-1, антитела к HCV и ВИЧ-1,2.
- 5.6. При работе с реагентами набора (К+1, К+2, К-, АНТИ-HBs-ПЛЮС и АНТИ-HBs-МИНУС) и исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- 5.7. Паспорт безопасности набора реагентов может быть представлен по запросу клиента.
- 5.8. Для получения надежных результатов необходимо:
- обеспечить условия хранения набора;
 - строго соблюдать требования инструкции по применению набора реагентов;
 - не использовать набор за пределами установленного срока годности.
- 5.9. Не использовать набор, если при вскрытии обнаружено повреждение пакета с Иммуносорбентом, протекание флаконов с жидкими реагентами, повреждение флаконов с лиофилизированными реагентами.

VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

- 6.1. Отходы, образующиеся в результате применения набора реагентов (включая принадлежности) по назначению, установленному производителем, а также неиспользованные изделия (истекший срок годности, поврежденная потребительская упаковка/маркировка, поврежденная упаковка/маркировка реагентов и т.д.) относятся к медицинским отходам класса «Б» в соответствии со ст. 49 Федерального закона от 21.11.2011 г. N 323-ФЗ «Об охране здоровья граждан в Российской Федерации».
- 6.2. Медицинские отходы подлежат сбору, обезвреживанию, размещению, хранению, транспортировке, учету и утилизации в соответствии с действующими правилами и нормативами (СанПиН 2.1.7.2790-10, СП 1.3.2322-08, МУ 287-113).

VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Вода дистиллированная (деионизированная);
- Дозаторы пипеточные переменного объёма для отбора жидкостей;
- Наконечники одноразовые для дозаторов пипеточных;
- Инкубатор микропланшетный (термостат) $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$;
- Термостатируемый шейкер (термошейкер) $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ или $(42,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$;
- Устройство для промывания планшетов (вошер);
- Планшетный спектрофотометр (ИФА-ридер) с фильтрами 450 нм и 620-680 нм;
- Для постановки ИФА в автоматическом режиме – любая модель ИФА-анализаторов открытого типа;
- Бумага фильтровальная лабораторная.

VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови проводить в соответствии с текущей практикой методом венопункции.

Для анализа использовать:

- неразведённые образцы сыворотки крови человека;
- неразведённые образцы плазмы крови человека, содержащие ЭДТА, цитрат натрия, гепарин.

Во избежание гемолиза нужно как можно быстрее отделить плазму от эритроцитов или сыворотку от сгустка. Образцы, содержащие агрегаты или осадок, осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин (15 мин, при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$).

Не использовать для анализа следующие образцы: термоинактивированные, консервированные азидом натрия, с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией.

Жидкие препараты крови исследовать неразведёнными; лиофильно высушенные препараты крови перед исследованием развести в соответствии с инструкцией по применению данного препарата.

Образцы можно хранить в соответствии с требованиями существующих нормативных документов. Длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 18 $^\circ\text{C}$ (замораживание/оттаивание не более 3 раз). Во избежание осаждения фибрина плазму размораживать в течение нескольких минут при температуре $(39,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на водяной бане.

IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

9.1 Общие требования и рекомендации:

- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:
 - неспецифических реагентов (**ПР, СБ**), которые взаимозаменяемы во всех наборах реагентов производства ООО «НПО «Диагностические системы»;
 - **Стоп-реагента**, который может быть взаимозаменяемым в зависимости от молярности раствора;

- другие реагенты также могут быть взаимозаменяемыми для постановки в большинстве тест-систем производства ООО «НПО «Диагностические системы»;
 - за более детальной информацией относительно других реагентов обратитесь в нашу службу поддержки пользователей по телефону бесплатной линии 8-800-555-0300 (доб. 7647, 7655) или по E-mail: info@npods.ru.
- Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение. Использовать одноразовую или чистую тщательно вымытую лабораторную посуду для приготовления реагентов. Не допускать контакта металлических предметов с Конъюгатом, ТМБ-Субстратным раствором или субстратной смесью.
 - Не подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.
 - Перед использованием флаконы с жидкими реагентами перемешать, не допуская вспенивания.

9.2 Реагенты, готовые к применению:

- **Иммуносорбент.** Планшет, состоящий из 12 стрипов и рамки, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1 см от края пакета, и взять необходимое количество стрипов.
- **К+1, К+2** (*при комплектации набора жидким реагентом К+2*), **К-, Стоп-реагент (0,2М), ТМБ-Субстратный раствор** (*при комплектации набора готовым ТМБ-Субстратным раствором*), **АНТИ-НВs-ПЛЮС, АНТИ-НВs-МИНУС.**

9.3 Реагенты, требующие предварительного приготовления:

- **К+2** (*при комплектации набора лиофилизированным реагентом*). Содержимое флакона растворить в объёме воды дистиллированной (деионизированной), указанном на этикетке флакона, осторожно перемешать и выдержать до использования 5-10 мин.
- **Рабочий ПР.** Необходимый объём концентрата ПР ($\times 25$) развести в 25 раз соответствующим объёмом воды, дистиллированной (деионизированной) (см. таблицу 2) и тщательно перемешать.
- **Рабочий Конъюгат.** Необходимый объём концентрата Конъюгата ($\times 11$) развести в 11 раз соответствующим объёмом РРК (см. таблицу 2), осторожно перемешать, не допуская вспенивания.

Возможно приготовление рабочего раствора непосредственно во флаконе с РРК. Для этого нужно отобрать дозатором пипеточным концентрат Конъюгата (1,2 мл), перенести во флакон с РРК (12,0 мл) и тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

Внимание! При постановке с инкубацией в течение 18 часов (процедура 1 – термостат $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$) объём концентрата Конъюгата ($\times 11$) для приготовления рабочего раствора Конъюгата может быть изменен. Кратность концентрата Конъюгата указана на дополнительной этикетке, на внутренней стороне фасовочной коробки.

- **Субстратная смесь (СС)** (при комплектации набора СБ – субстратным буферным раствором и ТМБ (концентрат $\times 11$)). Необходимый объём концентрата ТМБ ($\times 11$) развести в 11 раз соответствующим объёмом СБ (см. таблицу 2) и тщательно перемешать.

Возможно приготовление СС непосредственно во флаконе с СБ. Для этого нужно отобрать дозатором пипеточным необходимым объём ТМБ (2,5 мл или 5,0 мл), перенести в соответствующий флакон с СБ (25,0 мл или 50,0 мл) и тщательно перемешать.

Таблица 2

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов при ручной постановке ИФА

Количество используемых стрипов		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Рабочий ПР	ПР ($\times 25$), мл	3,0	6,0	9,0	12,0	15,0	18,0	21,0	24,0	27,0	30,0	33,0	40,0
	Вода, мл	72,0	144,0	216,0	288,0	360,0	432,0	504,0	576,0	648,0	720,0	792,0	960,0
Рабочий Конъюгат	Конъюгат ($\times 11$), мл	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,7
	РРК, мл	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	7,0
СС	ТМБ ($\times 11$), 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
	СБ, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

Х. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

10.1. Общие требования и рекомендации:

- Использовать валидированные дозаторы и оборудование.
- Использовать новые наконечники для каждого образца.
- Перед использованием набор реагентов выдержать не менее 30 мин при комнатной температуре.
- Перед использованием ванночки пластиковые для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной (деионизированной).
- Не использовать одну и ту же ванночку пластиковую для внесения Конъюгата, ТМБ-Субстратного раствора и субстратной смеси.
- Избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы.
- Не допускать высыхания лунок Иммуносорбента между отдельными операциями.
- Соблюдать требования к промывке (рекомендованное количество циклов, объём раствора при наполнении, временные интервалы, эффективность отсасывания).
- Многократные ванночки для ИФА-анализаторов сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной (деионизированной). Затем промыть 70% раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной (деионизированной).

10.2. Проведение ИФА при ручной постановке:

Возможны три альтернативные процедуры инкубации планшета. Очень важно, чтобы каждый этап постановки реакции осуществлялся по одной и той же процедуре. Сочетание процедур инкубации не допускается.

Процедура Этап	Процедура 1 (термостат (37,0 ± 1,0) °С)	Процедура 2 (термошейкер (42,0 ± 1,0) °С, 500 об/мин)	Процедура 3 (термошейкер (37,0 ± 1,0) °С, 500 об/мин)
Для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В			
1	Внести в лунки Иммуносорбента по 100 мкл контрольных и исследуемых образцов. 1-2 стрипа: 2 лунки – К-, 1 лунка – К+1, 2 лунки – К+2. 3 стрипа и более: 4 лунки – К-, 1 лунка – К+1, 3 лунки – К+2. К+2 используют для контроля чувствительности тест-системы. При дробном использовании планшета достаточно однократной постановки К+2.		
Для подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В			
1.1	В зависимости от числа подлежащих подтверждению образцов определить необходимое количество стрипов Иммуносорбента. Для подтверждения одного образца необходимы 2 лунки. Для внесения контрольных образцов необходимо зарезервировать 8 лунок.		
1.2	Внести в лунки Иммуносорбента по 100 мкл контрольных образцов: в 5 лунок – К-, в 3 лунки – К+. В остальные лунки Иммуносорбента внести исследуемые образцы каждый в 2 лунки по 100 мкл.		
1.3	В одну лунку с К-, К+ и каждым исследуемым образцом внести по 25 мкл реагента АНТИ-НВs-МИНУС. В другую лунку с К-, К+ и каждым исследуемым образцом внести по 25 мкл реагента АНТИ-НВs-ПЛЮС.		
2	Во все лунки внести по 50 мкл раствора рабочего Конъюгата. При добавлении Конъюгата не допускать заноса образца из одной лунки в другую через наконечники.		
3	Планшет накрыть защитной плёнкой, плотно прижав по всей поверхности планшета, и инкубировать:	Планшет без защитной плёнки инкубировать:	
	2 часа или 18 часов	1 час	1 час 30 мин
4	С помощью устройства для промывания планшетов удалить содержимое лунок и промыть планшет 4 раза рабочим раствором ПР. Для этого осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета до краёв (рекомендуется использовать автоматический микропланшетный вошер в режиме перекрёстной аспирации и пропускать через лунку не менее 500 мкл рабочего ПР), выдержать 40 сек, затем удалить в ёмкость с дезинфицирующим раствором. Удалить остатки влаги путем отстукивания по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге*.		
5	Во все лунки внести по 100 мкл СС или готового к применению ТМБ-Субстратного раствора.		

6	Планшет выдержать 20 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 25 °С или 15 мин при температуре $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.
7	Во все лунки внести по 150 мкл Стоп-реагента и через 2-3 мин провести учет результатов при 450/620-680 нм. Допустим учет результатов при одной длине волны – 450 нм. <i>При комплектации набора готовым к применению ТМБ-Субстратным раствором учет результатов можно проводить в течение 10 минут.</i>

Схема проведения ИФА приведена в Приложении.

** Для исключения неспецифического окрашивания раствора в лунках планшета с целью удаления остатков Конъюгата с поверхности Иммуносорбента, после промывки ПР допускается ополаскивание Иммуносорбента дистиллированной водой (заливая весь планшет и вытряхивая над ёмкостью) с последующим удалением остатков влаги путём отстукивания по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаги. Данную операцию проводить с использованием средств индивидуальной защиты (резиновых перчаток, защитных очков или экрана).*

10.3. Проведение ИФА в автоматическом режиме:

Для постановки набора в автоматическом режиме рекомендуется использовать протокол, предоставленный предприятием-изготовителем. При самостоятельном создании протокола, он должен соответствовать п. X «Проведение анализа», и должны выполняться все требования, описанные в п. V «Меры предосторожности».

При приготовлении рабочих растворов реагентов для автоматической постановки необходимо учитывать «мёртвый» объём флаконов или ёмкостей, используемых для загрузки рабочих растворов в ИФА-анализатор.

При постановке набора на ИФА-анализаторе для Комплектов 1 и 4 предполагается дробное использование планшета не более чем в трёх постановках, для Комплектов 2 и 3 не предполагается дробное использование планшета.

Протоколы постановки набора и таблицы разведения рабочих растворов реагентов для разных моделей ИФА-анализаторов можно получить от предприятия-изготовителя по запросу (см. п. XIV).

Производительность ИФА-анализаторов EVOLIS (BIO-RAD) и Best 2000 (Dyplex) составляет 44 теста/ч при тестировании одного планшета «ДС-ИФА-НВsAg» и 71 тест/ч при тестировании двух планшетов. Среднее время до получения первого результата составляет 2 ч 2 мин.

10.4. Спектрофотометрический контроль внесения образцов и реагентов при постановке на ИФА-анализаторах:

- Контроль внесения образцов рекомендуется проводить при длине волны 450 нм, критерий: ОП > 0,125.
- Контроль внесения рабочего раствора Конъюгата рекомендуется проводить при длине волны 620 нм, критерий: ОП > 0,400.
- Контроль внесения СС рекомендуется проводить при длине волны 405 нм, критерий: ОП > 0,050.

XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1 Для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В:

Результаты ИФА учитывать, если значение ОП в лунках с К+1 – не менее 0,600, а среднее значение ОП в лунках с К- – не более 0,120. Если одно из значений ОП К- выходит за этот предел, его следует исключить из расчёта среднего значения. Если исключению подлежат более одного значения ОП К-, анализ следует повторить.

ОП К+2 должна быть $\geq$ ОПкрит.

ОПкрит. рассчитывают по формуле:

$$\text{ОПкрит.} = \text{ОП К- ср.} + A,$$

где **A** – коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе, величину которого указывают для каждой серии в инструкции по применению, вкладываемой в коробку с набором и в паспорте на серию набора реагентов.¹

¹ «Для серии № 076XXX величина коэффициента $A=0,050$ »

Исследуемые образцы расцениваются как отрицательные: если ОП образца $<$ ОПкрит.

Исследуемые образцы расцениваются как положительные: если ОП образца $\geq$ ОПкрит.

Первичнопозитивные образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках для подтверждения первоначального результата. Если при повторном исследовании величина ОП образца в обеих лунках меньше ОПкрит., то образец расценивается как отрицательный. Если величина ОП образца в одной из лунок равна или больше ОПкрит., то данный образец должен быть протестирован в подтверждающем тесте, основанном на реакции нейтрализации.

11.2 Для подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В:

Расчет ОПкрит., оценку валидности результатов ИФА по ОП К-, ОП К+1, проводить как описано в п.11.1.

Значения ОП в лунках с К- после внесения АНТИ-HBs-МИНУС и АНТИ-HBs-ПЛЮС должны быть ниже ОПкрит.

Присутствие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в исследуемых образцах и К+1 определяется показателем нейтрализации – это соотношение значений ОП образца после нейтрализации и значений ОП образца до нейтрализации. Показатель нейтрализации (%) определяется по формуле:

$$\frac{(\text{ОПк} - \text{ОПн})}{(\text{ОПк} - \text{ОП К-ср.})} \times 100\%$$

где ОПк – оптическая плотность образца после внесения АНТИ-HBs-МИНУС;
ОПн – оптическая плотность образца после внесения АНТИ-HBs-ПЛЮС;

ОП К-ср. – среднее значение оптической плотности контрольного отрицательного образца.

Показатель нейтрализации ОП К+1 должен быть 50% и более.

Образец считается содержащим НВsAg, если соблюдаются 2 условия:

- $ОП_k \geq ОП_{крит.}$;
- показатель нейтрализации 50% и более.

В ряде случаев в образцах с $ОП \geq 1,0$ показатель нейтрализации может быть менее 50% из-за высокого содержания НВsAg. В этом случае образец следует развести рабочим промывочным раствором и повторить тестирование (рекомендуется развести в 25, 250 раз и более при необходимости). Образец считается содержащим НВsAg, если хотя бы для одного из выбранных разведений соблюдаются 2 условия:

- $ОП_k \geq ОП_{крит.}$;
- показатель нейтрализации 50% и более.

ХII. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

- Заключение о реактивности образцов к НВsAg не должно быть основано на единственном реактивном результате тестирования. Специфичность при получении положительных результатов при скрининге должна быть проверена дополнительным тестированием, например, в подтверждающем тесте.
- Отрицательные результаты могут быть получены, если количество поверхностного антигена вируса гепатита В в образце ниже уровня чувствительности теста, или если он отсутствует на той стадии заболевания, когда был отобран образец.
- Клинический диагноз не может основываться на результате одного теста, а должен базироваться на корреляции результатов лабораторных исследований с клиническими данными.
- Данная тест-система была разработана и исследована на индивидуальных сыворотках (плазмах) больных/доноров. Нельзя использовать объединённые образцы, поскольку точность таких результатов не исследовалась.

ХIII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

- **Срок годности набора реагентов – 24 месяца.** Условия хранения и транспортирования набора реагентов, условия и сроки хранения рабочих растворов, неиспользованных реагентов указаны в таблице 3.
- Транспортирование и хранение наборов должно проводиться в соответствии с СП 3.3.2.3332-16.
- Транспортировать наборы следует крытым транспортом, с соблюдением температурного режима, установленного изготовителем, в соответствии с установленными правилами перевозок. Наборы, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.
- Наборы, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

13.1	Условия хранения набора реагентов.		
	Хранить в сухом, защищённом от света месте при температуре от 2 до 8 °С в течение установленного срока годности. Замораживание не допускается. Набор реагентов с истекшим сроком годности использованию не подлежит.		
13.2	Условия транспортирования набора реагентов.		
	при температуре от 2 до 8 °С		
	при температуре от 9 до 25 °С	не более 10 сут	
	при температуре от 26 до 30 °С	не более 5 сут	
13.3	Условия и сроки хранения рабочих растворов (хранить в чистых флаконах или специальной ёмкости, предназначенной для постановки на ИФА-анализаторах, в защищённом от света месте)		
	Рабочий ПР	при температуре от 2 до 8 °С	не более 28 сут
		при температуре от 18 до 25 °С	не более 14 сут
	Рабочий Конъюгат	при температуре от 2 до 25 °С	не более 12 ч
	Регидратированный К+2	при температуре от 2 до 8 °С	не более 14 сут
		при температуре от 18 до 25 °С	не более 6 ч
	СС	при температуре от 2 до 25 °С	не более 10 ч
13.4	Условия и сроки хранения неиспользованных реагентов набора после вскрытия.		
	Хранить в сухом, защищённом от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.		
	Иммуносорбент	После вскрытия неиспользованные стрипы без рамки поместить в фольгированный пакет (не удаляя силикагель!) и тщательно герметизировать. Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и поместить фольгированный пакет со стрипами в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock.	в течение срока годности набора реагентов
	Конъюгат, РРК, К+1, К+2 (жидкий), К-, АНТИ-НВs-ПЛЮС, АНТИ-НВs-МИНУС, ПР, Стоп-реагент, СБ, ТМБ, ТМБ-Субстратный раствор	Флаконы плотно закрыть винтовыми крышками и хранить в упаковке производителя.	в течение срока годности набора реагентов

XIV. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

- Производитель гарантирует соответствие выпускаемого продукта требованиям нормативной и технической документации.
- Безопасность и качество набора реагентов гарантируются в течение всего установленного срока годности.
- Гарантии предприятия-изготовителя не распространяются при нарушении условий хранения и транспортирования, а также в случае несоблюдения инструкции по применению.
- Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя:

ООО «НПО «Диагностические системы»

603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, 22

Тел./факс: (831)434-86-83, 8-800-555-0300

E-mail: info@npods.ru, www.npods.ru.

Для проведения расследования и получения объективных выводов по заявленной рекламации необходимо предоставление:

1. рекламационного набора,
2. образцов плазмы/сыворотки пациента,
3. протоколов исследований с указанием серии набора реагентов, производителя и сроков годности.

XV. ОБЪЯСНЕНИЕ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СИМВОЛОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Срок годности (дата истечения срока годности в формате YYYY-MM-DD)
	Изготовитель		Обратитесь к инструкции по применению
	Номер по каталогу		Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения <i>n</i> -количества тестов (количество определений)		Не допускать воздействия солнечного света
	Код партии (номер серии)		Беречь от влаги
	Дата изготовления (YYYY-MM)		Внимание

СХЕМА АНАЛИЗА

Внести	По 100 мкл К-, К+1, К+2 (К+2 вносить для комплектов 1, 2, 3)
Внести	По 100 мкл исследуемых образцов
Внести	По 25 мкл АНТИ-НВs-ПЛЮС, АНТИ-НВs-МИНУС (выполнять только при использовании комплекта 4)
Внести	По 50 мкл раствора рабочего Конъюгата
Инкубировать	Процедура 1: 2 часа или 18 часов, $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$, термостат Процедура 2: 1 час, $(42,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$, 500 об/мин, термошейкер Процедура 3: 1 час 30 мин, $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$, 500 об/мин, термошейкер
Промыть планшет	Рабочий ПР, не менее 500 мкл, 4 раза
Внести	По 100 мкл СС или ТМБ-Субстратного раствора
Инкубировать	20 мин , 18 – 25 $^\circ\text{C}$, в защищённом от света месте или 15 мин , $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$, в защищённом от света месте
Внести	По 150 мкл Стоп-реагента
Учет результатов	450 нм/620-680 нм или 450 нм