«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

_____М.Д. Хусаинов

«___» _____ 2021 г.

м.п.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного подтверждения наличия HBsAg

(Вектогеп В-HBs-антиген-подтверждающий тест)

Комплект 2

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор «Вектогеп В-HBs-антиген-подтверждающий тест» предназначен для иммуноферментного подтверждения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке (плазме) крови, препаратах крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин).

1.2. Комплект 2 набора рассчитан на проведение 100 анализов, включая контроли с использованием любого комплекта набора реагентов для выявления HBsAg «Вектогеп В -HBs-антиген». Возможно использование набора в автоматических ИФА-анализаторах открытого типа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип метода заключается в проведении реакции нейтрализации (конкурентный ИФА) HBsAg в исследуемом образце с помощью поликлональных антител, содержащихся в растворе подтверждающего агента.

Первично положительные образцы исследуются с использованием нейтрализующих поликлональных антител в наборе «Вектогеп В-HBs-антиген-подтверждающий тест». Поликлональные антитела в растворе подтверждающего агента реагируют с антигенными детерминантами HBsAg, препятствуя связыванию антигена с антителами на твердой фазе и в составе конъюгата. При наличии в образце HBsAg наблюдается не менее чем 50% снижение значения оптической плотности в конкурентном ИФА по сравнению со значением в прямом ИФА, в котором вместо нейтрализующих антител добавляется раствор

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

для разведения образца. При исследовании ложноположительных образцов не наблюдается 50% снижения оптической плотности в конкурентном ИФА по сравнению с сигналом в прямом ИФА.

2.2. Состав набора:

–раствор подтверждающего агента (РПА) – 2 фл., по 0,8 мл;

–раствор для разведения образцов (РРО) – 2 фл., по 21,0 мл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность контролируется по разведениям стандартного образца предприятия, содержащего HBsAg субтипов ad и ay (СОП HBsAg ad, ay; рег. № 05-2-520). Для комплекта 2 при его использовании с набором «Вектогеп B-HBs-антиген»: растворы СОП HBsAg ad, ay с концентрацией HBsAg 0,05 МЕ/мл и ед. П-Э/мл (процедура 1) и 0,01 МЕ/мл и ед. П-Э/мл (процедура 2) должны интерпретироваться как положительные, т.е. содержащие HBsAg.

3.2. Специфичность контролируется по стандартной панели предприятия образцов сывороток крови, не содержащих HBsAg (СПП, рег. № 05-2-527), и составляет 100%. Для комплекта 2 при его использовании с набором «Вектогеп B-HBs-антиген»: все сыворотки СПП (100%) должны интерпретироваться как отрицательные, т.е. не содержащие HBsAg.

3.3. Диагностическая чувствительность: клинические испытания, проведенные на 284 положительных образцах сывороток и плазм крови от 259 больных гепатитом В в острой и хронической формах, показали 100 % чувствительность (интервал 98,9% - 100% с доверительной вероятностью 90%);

3.4. Диагностическая специфичность: клинические испытания, проведенные на 254 отрицательных образцах сывороток и плазм крови от 229 условно здоровых доноров крови, больных с другими инфекционными заболеваниями (больные гепатитом С, гепатитом А, ВИЧ-инфицированные пациенты), пациентов с положительным ревматоидным фактором, беременных и многорожавших женщин, показали 100% специфичность (интервал 98,7% - 100% с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

При работе с исследуемыми и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113 от 30.12.98.

- При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

- 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;

- автоматический промыватель для планшетов;

- холодильник бытовой;

- термостатируемый шейкер орбитального типа на 400–800 об/мин, поддерживающий температуру (37±1) °С и (44±1) °С;

- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);

- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 10 до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);

- перчатки медицинские диагностические одноразовые (ГОСТ Р 52239-2004);

- бумага фильтровальная лабораторная (ГОСТ 12026-76);

- цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл (ГОСТ 1770 -74);

- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);

- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113;

- набор реагентов для иммуноферментного выявления HBsAg «Вектоген В-HBs-антиген».

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для анализа использовать образцы сыворотки и плазмы (полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия, гепарина или ЭДТА). Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2–8) ºС не более 5 суток, либо при температуре минус (20 ± 4) °С, если необходимо более длительное хранение (допускается однократное замораживание/размораживание).

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать в течение 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

Лиофильно высушенные препараты крови перед исследованием растворить в соответствии с инструкцией по применению данного препарата. Жидкие препараты крови исследовать неразведенными.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Проведение анализа

7.1.1. Для проведения анализа необходим набор реагентов «Вектогеп В-HBs-антиген». Приготовить реагенты согласно инструкции по применению набора реагентов «Вектогеп В-HBs-антиген».

7.1.2. Во все лунки стрипов для прямого ИФА внести по 10 мкл раствора для разведения образца (РРО), а во все лунки стрипа для конкурентного ИФА — по 10 мкл раствора подтверждающего агента (РПА).

Контрольные и исследуемые образцы по 100 мкл внести попарно в лунки стрипов прямого и конкурентного ИФА. Например, в лунки А-1 и А-2 внести по 100 мкл $К^{+}$, в лунки В-1 и В-2 внести по 100 мкл $К^{+}_{слаб}$, в лунки С-1, С-2, D-1 и D-2 – по 100 мкл $К^{-}$. В остальные лунки внести попарно по 100 мкл исследуемых образцов.

7.1.3. Далее действовать в соответствии с инструкцией по применению набора «Вектогеп В-HBs-антиген» до стадии внесения в лунки стоп-реагента.

7.1.4. Непосредственно перед внесением стоп-реагента измерить оптическую плотность, используя фильтр 450 нм.

Это вспомогательное измерение ОП, которое необходимо для анализа образцов, с ОП больше 2,0 о. е. в прямом и конкурентном ИФА в основном измерении после добавления стоп-реагента.

Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин измерить оптическую плотность (ОП).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА при основном измерении регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Допустима регистрация результатов и без референс-фильтра.

Результаты ИФА при вспомогательном измерении проводить с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Используя основное измерение, рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср}К^-$), в которые добавлены РРО и РПА.

9.2. Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}\ (К^-) + 0{,}04 \qquad (1)$$

9.3. Вычислить % подавления положительного контрольного образца ($К^+$), слабоположительного контрольного образца ($К^+_{слаб}$) по формуле:

$$\%\ \text{подавления} = \frac{ОП_{прям} - ОП_{конк.}}{ОП_{прям} - ОП_{ср.}К^-} \times 100\% \qquad (2)$$

где: $ОП_{прям}$ – оптическая плотность положительных образцов в лунках для прямого ИФА,

$ОП_{конк}$ – оптическая плотность положительных образцов в лунках для конкурентного ИФА.

9.4. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– значение $ОП_{ср}$ К– не должно превышать 0,10 ед. опт. пл. при использовании двухволнового режима измерения или 0,15 ед. опт. пл. при измерении на одной длине волны;

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом в прямом ИФА ОП ($К^+_{прям}$) должно быть не менее 1,0 ед. опт. плотн; % подавления в конкурентном ИФА должен быть не менее 50%.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– значение оптической плотности в лунке со слабоположительным контрольным образцом в прямом ИФА ОП ($К^{+}_{слаб.\ прям}$) должно быть не менее $ОП_{крит}$; % подавления в конкурентном ИФА должен быть не менее 50%.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычислить % подавления анализируемых образцов согласно формуле (2) (см. п. 9.3).

Для образцов, у которых одновременно ОП $_{обр}$ в прямом и конкурентном ИФА > 2 о.е., а % подавления < 50%, вычислить отношение П/К по вспомогательному измерению $ОП_{обр}$ (см. п. 7.3.7).

П/К = ОП $_{обр}$ в прямом ИФА(П) / ОП $_{обр}$ в конкурентном ИФА(К)

Если для такого образца отношение П/К ≥ 2, подтверждение есть (образец содержит HBsAg). Если отношение П/К < 2, необходимо развести образец с помощью РРО последовательно 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:500000 и повторить анализ, чтобы достигнуть показателей П/К ≥ 2 или % подавления ≥ 50% (подтверждение) или ОП разведенного образца< $ОП_{крит}$ в прямом ИФА (нет подтверждения).

Если ОП образца ($ОП_{обр}$) в прямом ИФА превышает или равна 1,2 × $ОП_{крит}$, % подавления больше или равен 50% , подтверждение есть (образец содержит HBsAg).

В сомнительных случаях, когда 0,8 × $ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$, % подавления ≥ 50%, или $ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < 1,2 \times ОП_{крит}$, но % подавления < 50%, необходимо повторить анализ. В случае воспроизведения результатов считать, что подтверждения нет.

Если 0,8 × $ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$, % подавления < 50%, подтверждения нет.

Если $ОП_{обр}$ в прямом ИФА меньше 0,8 × $ОП_{крит}$, то независимо от % подавления подтверждения нет (см. Таблицу).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица

ОП $_{обр}$ в прямом ИФА при основном измерении	% подавления при основном измерении	П/К при вспомогательном измерении	Интерпретация
$ОП_{обр} \geq 1{,}2 \times ОП_{крит}$	≥50%	Не вычислять	подтверждение, образец положительный
$ОП_{обр}$ >2 о.е.	<50%	П/К≥ 2	
	<50%	П/К < 2	сомнительный, развести с помощью РРО в 100, 1000, 10000, 100000, 500000 раз и исследовать повторно
$0{,}8 \times ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$	≥50%	Не вычислять	сомнительный, исследовать повторно, при воспроизведении результата считать, что подтверждения нет
$ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < 1{,}2 \times ОП_{крит}$	<50%		
$0{,}8 \times ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$	<50%	Не вычислять	нет подтверждения, образец отрицательный
$ОП_{обр} < 0{,}8 \times ОП_{крит}$	Любое значение	Не вычислять	нет подтверждения, образец отрицательный

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2-8) °С.

10.3. Срок годности набора реагентов – 24 месяца со дня выпуска.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение 12 месяцев после его вскрытия. В случае дробного использования набора:

– раствор подтверждающего агента и раствор для разведения образцов после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) °С в течение 12 месяцев.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора **«Вектоген B-HBs-антиген-подтверждающий тест»**, обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

_____М.Д. Хусаинов

«___» _____ 2021 г.

м.п.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного подтверждения наличия HBsAg

(Вектогеп В-HBs-антиген-подтверждающий тест)

Комплект 1

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор «Вектогеп В-HBs-антиген-подтверждающий тест» предназначен для иммуноферментного подтверждения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке (плазме) крови, препаратах крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин).

1.2. Комплект 1 набора рассчитан на проведение 48 анализов, включая контроли. Для исследования небольшой партии проб возможны 6 независимых постановок ИФА по 8 анализов, включая контрольные. Возможно использование набора в автоматических ИФА-анализаторах открытого типа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип метода заключается в проведении реакции нейтрализации (конкурентный ИФА) HBsAg в исследуемом образце с помощью поликлональных антител, содержащихся в растворе подтверждающего агента.

Первично положительные образцы исследуются с использованием нейтрализующих поликлональных антител в наборе «Вектогеп В-HBs-антиген-подтверждающий тест». Поликлональные антитела в растворе подтверждающего агента реагируют с антигенными детерминантами HBsAg, препятствуя связыванию антигена с антителами на твердой фазе и в составе конъюгата. При наличии в образце HBsAg наблюдается не менее чем 50% снижение значения оптической плотности в конкурентном ИФА по сравнению со значением в прямом ИФА, в котором вместо нейтрализующих антител добавляется раствор для разведения образца. При исследовании ложноположительных образцов не наблюдается

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

50% снижения оптической плотности в конкурентном ИФА по сравнению с сигналом в прямом ИФА.

2.2. Состав набора:

–планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к HBsAg – 1 шт.;

–положительный контрольный образец ($К^+$), инактивированный, содержит 4,0±2,0 МЕ/мл HBsAg – 1 фл., 1,5 мл;

–слабоположительный контрольный образец ($К^+_{слаб}$), инактивированный, содержит 0,2±0,1 МЕ/мл HBsAg – 1 фл. 1,5 мл;

– отрицательный контрольный образец ($К^–$), инактивированный – 1 фл., 2,5 мл;

– конъюгат, концентрат – поликлональные антитела к HBsAg, меченые пероксидазой хрена – 1 фл., 0,7 мл;

– раствор для разведения конъюгата (РК) – 1 фл., 7,0 мл;

–концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28,0 мл;

–тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;

–раствор подтверждающего агента (РПА) – 1 фл., 0,8 мл;

–раствор для разведения образцов (РРО) – 1 фл., 21,0 мл;

–субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13,0 мл;

–стоп-реагент – 1 фл., 12,0 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

–пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;

–ванночками для реагентов – 2 шт.;

–наконечниками для пипеток на 4-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность контролируется по разведениям стандартного образца предприятия, содержащего HBsAg субтипов ad и ay (СОП HBsAg ad, ay; рег. № 05-2-520). Растворы СОП HBsAg ad, ay с концентрацией HBsAg 0,05 МЕ/мл и ед. П-Э/мл (процедура 1) и 0,01 МЕ/мл и ед. П-Э/мл (процедура 2) должны интерпретироваться как положительные, т.е. содержащие HBsAg.

3.2. Специфичность контролируется по стандартной панели предприятия образцов сывороток крови, не содержащих HBsAg (СПП, рег. № 05-2-527), и составляет 100%. Все сыворотки СПП (100%) должны интерпретироваться как отрицательные, т.е. не содержащие HBsAg.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.3. Диагностическая чувствительность: клинические испытания, проведенные на 284 положительных образцах сывороток и плазм крови от 259 больных гепатитом В в острой и хронической формах, показали 100 % чувствительность (интервал 98,9% - 100% с доверительной вероятностью 90%);

3.4. Диагностическая специфичность: клинические испытания, проведенные на 254 отрицательных образцах сывороток и плазм крови от 229 условно здоровых доноров крови, больных с другими инфекционными заболеваниями (больные гепатитом С, гепатитом А, ВИЧ-инфицированные пациенты), пациентов с положительным ревматоидным фактором, беременных и многорожавших женщин, показали 100% специфичность (интервал 98,7% - 100% с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

При работе с исследуемыми и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;

- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113 от 30.12.98.

- При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

- 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;
- автоматический промыватель для планшетов;
- холодильник бытовой;
- термостатируемый шейкер орбитального типа на 400–800 об/мин, поддерживающий температуру (37±1) °С и (44±1) °С;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 10 до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- перчатки медицинские диагностические одноразовые (ГОСТ Р 52239-2004);
- бумага фильтровальная лабораторная (ГОСТ 12026-76);
- цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл (ГОСТ 1770 -74);
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);
- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа использовать образцы сыворотки и плазмы (полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия, гепарина или ЭДТА). Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2–8) ºС не более 5 суток, либо при температуре минус (20 ± 4) °С, если необходимо более длительное хранение (допускается однократное замораживание/размораживание).

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать в течение 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

Лиофильно высушенные препараты крови перед исследованием растворить в соответствии с инструкцией по применению данного препарата. Жидкие препараты крови исследовать неразведенными.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. *Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.*

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25) °С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник при температуре (2–8) ºС.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина в рабочем разведении.

При промывке лунки стрипов заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через край лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 с.

При использовании автоматического промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, СБР, концентрат ТМБ), которые взаимозаменяемы в наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Наконечники для пипеток (автоматических дозаторов) следует использовать однократно.

Посуду (ванночки), используемые для работы с конъюгатом и тетраметилбензидином в рабочем разведении, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата в рабочем разведении промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки) для тетраметилбензидина в рабочем разведении сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов (МУ-287-113 от 30.12.98).

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см. таблицу расхода реагентов) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

Хранение: промывочный раствор хранить при температуре (2-8) ºС не более 1 месяца или при температуре (18-25) °С не более 7 дней.

7.2.2. Раствор конъюгата в рабочем разведении

<u>Внимание!</u> Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток.

В соответствии с числом стрипов (см. таблицу расхода реагентов) в пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрата конъюгата и добавить соответствующее количество раствора для разведения конъюгата (РК), тщательно перемешать.

Хранение: раствор конъюгата в рабочем разведении стабилен в течение 1 мес. при температуре (2-8) ºС.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов					
	2	4	6	8	10	12
Промывочный раствор						
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12
Дистиллированная вода, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300
Раствор конъюгата в рабочем разведении						
Конъюгат (концентрат), мкл	100	200	300	400	500	600
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
Раствор ТМБ в рабочем разведении						
ТМБ (концентрат), мкл	100	200	300	400	500	600
СБР, мл	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0

7.2.3. Раствор ТМБ в рабочем разведении

<u>Внимание</u>! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. *Для работы с раствором ТМБ использовать одноразовые наконечники для пипеток*.

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрата ТМБ и добавить требуемое количество СБР (см. таблицу расхода реагентов), тщательно перемешать пипетированием.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение: Раствор ТМБ в рабочем разведении стабилен до 10 ч в защищенном от прямого солнечного света месте при температуре (18-25) ºС.

7.3. Проведение анализа

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при температуре (2–8) ºС в течение 12 месяцев.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1), раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.2), раствор ТМБ в рабочем разведении (п. 7.2.3).

7.3.2. Во все лунки стрипов для прямого ИФА внести по 10 мкл раствора для разведения образца (РРО), а во все лунки стрипа для конкурентного ИФА — по 10 мкл раствора подтверждающего агента (РПА).

Контрольные и исследуемые образцы по 100 мкл внести попарно в лунки стрипов прямого и конкурентного ИФА. Например, в лунки А-1 и А-2 внести по 100 мкл $К^{+}$, в лунки В-1 и В-2 внести по 100 мкл $К^{+}_{слаб}$, в лунки С-1, С-2, D-1 и D-2 – по 100 мкл $К^{-}$. В остальные лунки внести попарно по 100 мкл исследуемых образцов.

7.3.3. Во все лунки внести по 50 мкл приготовленного раствора конъюгата.

<u>Внимание!</u> Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.3.4. Планшет заклеить пленкой и инкубировать, используя по выбору какой-либо из следующих режимов:

процедура 1 — 44°С 1 час, шейкер, 500 об/мин;

процедура 2 — 37°С 3 часа, шейкер, 500 об/мин.

7.3.5. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть планшет 5 раз промывочным раствором.

<u>Внимание!</u> Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора в режиме overflow – избыточной промывки). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Использовать крестообразное отсасывание жидкости из лунок, чтобы остаточный объём не превышал 10 мкл. Если остаточный объём в лунке больше 10 мкл, удалить влагу из лунок, постукивая перевёрнутым планшетом по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге.

7.3.6. Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

<u>Внимание!</u> Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, прилагаемые к набору.

Планшет поместить в защищенное от прямого солнечного света место на 25 мин при температуре (18-25) °С или на 20 мин при 37 °С.

7.3.7. Непосредственно перед внесением стоп-реагента измерить оптическую плотность, используя фильтр 450 нм.

Это вспомогательное измерение ОП, которое необходимо для анализа образцов, с ОП больше 2,0 о. е. в прямом и конкурентном ИФА в основном измерении после добавления стоп-реагента.

Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин измерить оптическую плотность (ОП).

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА при основном измерении регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Допустима регистрация результатов и без референс-фильтра.

Результаты ИФА при вспомогательном измерении проводить с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Используя основное измерение, рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср}К^-$), в которые добавлены РРО и РПА.

9.2. Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}\,(К^-) + 0{,}04 \qquad (1)$$

9.3. Вычислить % подавления положительного контрольного образца ($К^+$), слабоположительного контрольного образца ($К^+_{слаб}$) по формуле:

$$\%\ \text{подавления} = \frac{ОП_{прям} - ОП_{конк.}}{ОП_{прям} - ОП_{ср.}К^-} \times 100\% \qquad (2)$$

где: $ОП_{прям}$ – оптическая плотность положительных образцов в лунках для прямого ИФА,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

$ОП_{конк}$ – оптическая плотность положительных образцов в лунках для конкурентного ИФА.

9.4. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– значение $ОП_{ср}$ К– не должно превышать 0,10 ед. опт. пл. при использовании двухволнового режима измерения или 0,15 ед. опт. пл. при измерении на одной длине волны;

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом в прямом ИФА ОП ($К^{+}_{прям}$) должно быть не менее 1,0 ед. опт. плотн; % подавления в конкурентном ИФА должен быть не менее 50%.

– значение оптической плотности в лунке со слабоположительным контрольным образцом в прямом ИФА ОП ($К^{+}_{слаб.\ прям}$) должно быть не менее $ОП_{крит}$; % подавления в конкурентном ИФА должен быть не менее 50%.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычислить % подавления анализируемых образцов согласно формуле (2) (см. п. 9.3).

Для образцов, у которых одновременно $ОП_{обр}$ в прямом и конкурентном ИФА > 2 о.е., а % подавления < 50%, вычислить отношение П/К по вспомогательному измерению $ОП_{обр}$ (см. п. 7.3.7).

П/К = $ОП_{обр}$ в прямом ИФА(П) / $ОП_{обр}$ в конкурентном ИФА(К)

Если для такого образца отношение П/К ≥ 2, подтверждение есть (образец содержит HBsAg). Если отношение П/К < 2, необходимо развести образец с помощью РРО последовательно 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:500000 и повторить анализ, чтобы достигнуть показателей П/К ≥ 2 или % подавления ≥ 50% (подтверждение) или ОП разведенного образца< $ОП_{крит}$ в прямом ИФА (нет подтверждения).

Если ОП образца ($ОП_{обр}$) в прямом ИФА превышает или равна 1,2 × $ОП_{крит}$, % подавления больше или равен 50%, подтверждение есть (образец содержит HBsAg).

В сомнительных случаях, когда 0,8 × $ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$, % подавления ≥ 50%, или $ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < 1,2 \times ОП_{крит}$, но % подавления < 50%, необходимо повторить анализ. В случае воспроизведения результатов считать, что подтверждения нет.

Если 0,8 × $ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$, % подавления < 50%, подтверждения нет.

Если $ОП_{обр}$ в прямом ИФА меньше 0,8 × $ОП_{крит}$, то независимо от % подавления подтверждения нет (см. Таблицу).

Таблица

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОП $_{обр}$ в прямом ИФА при основном измерении	% подавления при основном измерении	П/К при вспомогательном измерении	Интерпретация
$ОП_{обр} \geq 1{,}2 \times ОП_{крит}$	≥50%	Не вычислять	подтверждение, образец положительный
$ОП_{обр}$ >2 о.е.	<50%	П/К≥ 2	
	<50%	П/К < 2	сомнительный, развести с помощью РРО в 100, 1000, 10000, 100000, 500000 раз и исследовать повторно
$0{,}8 \times ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$	≥50%	Не вычислять	сомнительный, исследовать повторно, при воспроизведении результата считать, что подтверждения нет
$ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < 1{,}2 \times ОП_{крит}$	<50%		
$0{,}8 \times ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$	<50%	Не вычислять	нет подтверждения, образец отрицательный
$ОП_{обр} < 0{,}8 \times ОП_{крит}$	Любое значение	Не вычислять	нет подтверждения, образец отрицательный

10.УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2-8) °С.

10.3. Срок годности набора реагентов – 24 месяца со дня выпуска.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение 12 месяцев после его вскрытия. В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2–8) ºС в течение 12 месяцев;

– контрольные образцы, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор, раствор для разведения конъюгата, раствор подтверждающего агента, раствор для разведения образцов, концентрат конъюгата, концентрат тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) °С в течение 12 месяцев;

– промывочный раствор можно хранить при температуре (2-8) ºС не более 1 месяца или при температуре (18-25) °С не более 7 дней;

– раствор конъюгата в рабочем разведении можно хранить в течение 1 месяца при температуре (2-8) ºС;

– раствор ТМБ в рабочем разведении можно хранить до 10 ч в защищенном от прямого солнечного света месте при температуре (18-25) ºС.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора **«Вектоген В-HBs-антиген-подтверждающий тест»**, обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru