НАУЧНО–ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

REF **В-551** **96**

И Н С Т Р У К Ц И Я
по применению набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-HBsAg»

Тест-система иммуноферментная для качественного и количественного определения антител к поверхностному антигену вируса гепатита В, набор диагностический

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

Содержание

I. НАЗНАЧЕНИЕ....3
II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-АНТИ-HBsAg»....3
III. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ....5
IV. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ....5
V. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ....6
VI. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ....7
VII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ....7
VIII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ....8
IX. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА....9
X. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ....12
XI. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ....14
XII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ....15
Приложение 1....16
Приложение 2....18

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

Набор реагентов выпускается в 1 комплекте:
Комплект рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для одновременной постановки 96 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-HBsAg» - тест-система иммуноферментная для качественного и количественного определения антител к поверхностному антигену вируса гепатита В с целью специфической диагностики инфекции, определения тяжести течения и прогноза заболевания, для изучения иммунного статуса населения в предвакцинальный период, оценки эффективности вакцинации и иммунного ответа, а также при отборе плазмы крови человека с высоким содержанием анти-HBsAg для приготовления специфических иммуноглобулинов.

II. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ДС-ИФА-АНТИ-HBsAg»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - полистироловый разборный планшет, в лунках которого сорбирована смесь рекомбинантных HBs антигенов субтипов ad и ay.	1 планшет
Конъюгат (концентрат) – смесь очищенных плазменных HBs антигенов субтипов ad и ay, конъюгированных с пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
РРК (раствор для разведения конъюгата) - опалесцирующая синего цвета жидкость, допустимо образование осадка.	1 флакон 13,0 мл
БР (блокирующий раствор) - для рабочего разведения контрольных и исследуемых образцов. Прозрачная или опалесцирующая фиолетового цвета жидкость	1 флакон 6,0 мл
К1+ (Контрольный положительный образец (калибратор 1)) – сыворотка (плазма) крови человека, содержащая антитела к HBsAg в концентрации 150 мМЕ/мл, не содержащая HBsAg, антиген p24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая малиново-красного цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
К2+ (Контрольный положительный образец (калибратор 2)) – сыворотка (плазма) крови человека, содержащая антитела к HBsAg в концентрации 100 мМЕ/мл, не содержащая HBsAg, антиген p24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая ярко-розового цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
К3+ (Контрольный положительный образец (калибратор 3)) – сыворотка (плазма) крови человека, содержащая антитела к HBsAg в концентрации 50 мМЕ/мл, не содержащая HBsAg, антиген p24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая розового цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл

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

К4+ (Контрольный положительный образец (калибратор 4)) – сыворотка (плазма) крови человека, содержащая антитела к HBsAg в концентрации 10 мМЕ/мл, не содержащая HBsAg, антиген p24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая бледно-розового цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
К0 (Контрольный отрицательный образец, 0 мМЕ/мл (Калибратор 0)) – сыворотка (плазма) крови человека, не содержащая антитела к HBsAg, HBsAg, антиген p24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С; инактивированная. Прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 4,0 мл*
Контрольная сыворотка - сыворотка крови человека с известным содержанием анти-HBsAg, не содержащая HBsAg, антиген p24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, инактивированная; значение концентрации анти-HBsAg в сыворотке указано на этикетке флакона. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл
ПР (промывочный раствор) – концентрат 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
Стоп-реагент - раствор серной кислоты. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор, готовый к применению. Прозрачная бесцветная жидкость. или СБ - субстратный буферный раствор, цитратный буфер, содержащий раствор перекиси водорода. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 14,0 мл или 1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл
Хромоген ТМБ - раствор, содержащий 3,3′,5,5′- тетраметилбензидин. Прозрачная бесцветная жидкость (возможно наличие окраски).	1 флакон 2,5 мл
Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или	1 шт.
защитная плёнка для ИФА планшетов	2 шт.
Пластиковая скрепка или полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock для закрывания пакета с иммуносорбентом	1 шт.
Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.
Одноразовые наконечники	16 шт.
Бумага миллиметровая	1 шт.

Примечание: концентрации анти-HBsAg в контрольных положительных образцах (калибраторах 1-4) могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов.

* Возможна дополнительная комплектация флаконами с К0 (калибратором 0) по желанию заказчика.

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

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами. Имеется цветовая кодировка реагентов, а также маркировка посредством штрих-кодов. Набор упакован в коробку картонную, куда вкладывается инструкция по применению.

III. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

(см. Приложение 1 к данной инструкции).

IV. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

3.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ Министерства здравоохранения РФ № 4Н от 06 июня 2012 г.).

3.2. Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой.
- Нельзя использовать реагенты с истекшим сроком годности.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:

– неспецифических компонентов (ПР, СБ), которые взаимозаменяемы во всех тест-системах производства ООО «НПО «Диагностические системы»;

– стоп-реагента, который может быть взаимозаменяемым в зависимости от молярности раствора;

– за более детальной информацией относительно других реагентов обратитесь в нашу службу поддержки пользователей по телефону бесплатной линии 8-800-555-0300 (доб. 7655, 7626) или по E-mail: info@npods.ru.

- Перед использованием все реагенты набора выдержать при комнатной температуре в течение 30 мин.
- Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить тест в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на ферментативную активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.
- Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной. Многоразовые ванночки для автоматических анализаторов необходимо сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной. Затем промыть 70% раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной.
- Нельзя допускать высыхания лунок планшета иммуносорбента между отдельными операциями
- Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстратов.

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

- Необходимо использовать новый наконечник для каждого образца или реагента.
- Промывка лунок - важный этап в данной процедуре: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполнены, не допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.
- Нельзя использовать одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и растворов.
- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование.
- Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- Необходимо использовать воду высокого качества.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию тепла или света во время инкубации и хранения.

V. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении контрольных образцов (К1+, К2+, К3+, К4+, К0, контрольная сыворотка), были протестированы и определены нереактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к вирусу гепатита С и ВИЧ-1,2.
- При работе с реагентами набора (К1+, К2+, К3+, К4+, К0, контрольная сыворотка) необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спец. одежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезинфицировать поверхность 3% раствором хлорамина Б.
- Необходимо избегать контакта субстратного буфера, хромогена, стоп-реагента с кожей и слизистыми.

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

- После проведения ферментативной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кГ/см^2 (0,15 МПа). Допустимо обеззараживание твердых отходов способом погружения в 3% раствор хлорамина Б (длительность дезинфекции не менее 1 часа) или другого разрешенного к промышленному выпуску и применению в РФ дезинфицирующего средства. Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кГ/см^2 (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.
- При утилизации и уничтожении все реагенты и материалы, являющиеся отходами, должны быть обработаны в соответствии с действующими нормативами (СанПиН 2.1.7.2790-10, СП 1.3.2322-08).
-  Некоторые реагенты содержат 0,2% проклин 300. Проклин 300 - раздражающее вещество. Может вызвать сенсибилизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

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

- Вода дистиллированная или деионизированная.
- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или предварительно устанавливаемые одноканальные или многоканальные пипетки с изменяемым объемом для отбора жидкостей.
- Одноразовые наконечники к пипеткам.
- Инкубатор микропланшетный или термостатируемый шейкер (37,0 ± 1,0) °С.
- Автоматический микропланшетный вошер.
- Градуированные цилиндры: 25 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Микропланшетный ридер с возможностью измерения оптической плотности (ОП) при фильтрах 450 нм, 405 нм и 620-680 нм.

VII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови должен проводиться в соответствии с надлежащей практикой методом венопункции. В качестве исследуемых образцов могут быть использованы сыворотка (плазма) крови человека или препараты крови. Сыворотку от сгустка или плазму от эритроцитов следует отделить как можно быстрее, чтобы избежать гемолиза. Гемолиз может повлиять на рабочие характеристики теста. Образцы, содержащие видимые частицы, следует осветлить центрифугированием. Взвешенные частицы фибрина и агрегаты могут привести к ложноположительным результатам.

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

Жидкие препараты крови исследовать неразведенными в соответствии с инструкцией по применению данного набора.

Образцы можно хранить в соответствии с требованиями существующих нормативных документов. Допускается длительное хранение образцов (несколько месяцев) при условии глубокой заморозки (ниже -20°С). Во избежание осаждения фибрина плазму следует быстро размораживать в течение нескольких минут при температуре 40 °С в водяной бане. Нельзя использовать сыворотку (плазму), замороженную и размороженную более 3-х раз. Нельзя использовать сыворотку (плазму) загрязненную, с гемолизом или гиперлипидемией.

VIII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:

- **Иммуносорбент.** Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет и вынуть планшет. Взять необходимое количество стрипов. Неиспользованные стрипы без рамки поместить обратно в фольгированный пакет (не удаляя силикагель!) и тщательно герметизировать. Для этого поместить вскрытый пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или край фольгированного пакета свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета. После вскрытия пакета иммуносорбент стабилен на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С
- **К0 -** контрольный отрицательный образец (калибратор 0);
- **К1+ -** контрольный положительный образец (калибратор 1);
- **К2+ -** контрольный положительный образец (калибратор 2);
- **К3+ -** контрольный положительный образец (калибратор 3);
- **К4+ -** контрольный положительный образец (калибратор 4).
- **Контрольная сыворотка;**
- **РРК - раствор для разведения конъюгата;**
- **БР - блокирующий раствор для рабочего разведения контрольных и исследуемых образцов;**
- **Стоп-реагент 0,2 М.**
- **ТМБ-Субстратный раствор (при комплектации набора готовым ТМБ-Субстратным раствором).**

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

- **Рабочий промывочный раствор (ПР).** Содержимое флакона с концентратом (х 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимый объем концентрата (х 25) промывочного раствора развести соответствующим объемом воды дистиллированной (см. табл. 2). Полученный раствор тщательно перемешать. Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут. при комнатной температуре или 28 сут. при температуре от 2 до 8 °С.

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

- **Рабочий раствор конъюгата**. Необходимое количество РРК перенести в чистый флакон, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата (см. табл. 2) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Рабочий раствор конъюгата стабилен не менее 12 часов в защищенном от света месте при комнатной температуре или в течение 2-х недель в защищённом от света месте при температуре от 2 до 8 °С. В РРК допустимо образование осадка**.**
- **Субстратная смесь (СС)** *(при комплектации набора СБ-субстратным буферным раствором и хромогеном ТМБ)*. Развести необходимый объем СБ соответствующим объемом ТМБ (см. табл. 2). Тщательно перемешать до полного растворения.

Хранение: допустимо хранение СС не более 10 ч в защищённом от света месте при комнатной температуре в химически чистых емкостях.

После вскрытия флаконов и пакета с иммуносорбентом, оставшиеся не использованными реагенты хранить в течение срока годности тест-системы.

Внимание! ТМБ - Субстратный раствор, готовый к применению хранить строго в упаковке производителя. Не следует переливать его в другие емкости для длительного хранения.

IX. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при комнатной температуре.

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблице 2.

Таблица 2

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

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор (ПР)		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц. х 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. х 11) (мл)	РРК (мл)	СБ (мл)	ТМБ (мл)
1	4	до 100.0	0,1	1,0	1,0	0,1
2	8	до 200.0	0,2	2,0	2,0	0,2
3	12	до 300.0	0,3	3,0	3,0	0,3
4	16	до 400.0	0,4	4,0	4,0	0,4
5	20	до 500.0	0,5	5,0	5,0	0,5
6	24	до 600.0	0,6	6,0	6,0	0,6
7	28	до 700.0	0,7	7,0	7,0	0,7
8	32	до 800.0	0,8	8,0	8,0	0,8
9	36	до 900.0	0,9	9,0	9,0	0,9
10	40	до 1000.0	1,0	10,0	10,0	1,0
11	44	до 1100.0	1,1	11,0	11,0	1,1
12	48	до 1200.0	1,2	12,0	12,0	1,2

Перед использованием иммуносорбент не промывать!

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

Постановка качественного анализа.

1. Во все лунки планшета внести по 25 мкл БР.

2. Контрольные образцы рекомендуется вносить по следующей схеме в зависимости от количества используемых стрипов:

1 стрип: - 1 лунка - 75 мкл К1+, 1 лунка – 75 мкл К4+, 2 лунки по 75 мкл К0;

2 стрипа: - 2 лунки по 75 мкл К1+, 2 лунки по 75 мкл К4+, 2 лунки по 75 мкл К0;

3 стрипа и более: - 2 лунки по 75 мкл К1+, 2 лунки по 75 мкл К4+, 3 лунки по 75 мкл К0.

В остальные лунки внести по 75 мкл цельных исследуемых образцов сыворотки или плазмы крови. При этом содержимое лунок изменяет свой цвет с фиолетового на сине-зелёный.

3. Внимание! Возможны две процедуры инкубации планшета.

Процедура 1 - термостатируемый шейкер, (37,0 ± 1,0) °С:

3.1. Планшет выдержать 30 мин в термостатируемом шейкере при 500 об/мин и температуре (37,0 ± 1,0) °С.

3.2. Содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дезинфицирующим раствором используя автоматический микропланшетный вошер, планшет промыть 4 раза рабочим ПР: внести рабочий ПР в лунки планшета с помощью промывочного устройства до краев лунок (не менее 400 мкл в лунку), выдержать 40 с, затем удалить промывочный раствор в емкость с дезинфицирующим раствором. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.

3.3. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Планшет выдержать 30 мин в термостатируемом шейкере при 500 об/мин и температуре (37,0 ± 1,0) °С.

3.4. Содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дезинфицирующим раствором используя автоматический микропланшетный вошер, планшет промыть 4 раза рабочим ПР, , как указано в п.3.2.

3.5. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл СС или ТМБ – Субстратного раствора и планшет выдержать в течение 25 мин в защищённом от света месте при комнатной температуре.

3.6. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента, содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета и через 1-2 минуты провести учет результатов при основном фильтре 450 нм и референс-фильтре 620-680 нм, используя ридер. Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм.

Процедура 2 – инкубатор микропланшетный (37,0 ± 1,0) °С:

3.1. После внесения образцов содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета, планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в течение 60 мин в инкубаторе микропланшетном при температуре (37,0 ± 1,0) °С.

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

3.2. Содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дезинфицирующим раствором используя автоматический микропланшетный вошер, планшет промыть 4 раза рабочим ПР: внести рабочий ПР в лунки планшета с помощью промывочного устройства до краев лунок (не менее 400 мкл в лунку), выдержать 40 с, затем удалить промывочный раствор в емкость с дезинфицирующим раствором. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.

3.3. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета, планшет закрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в течение 30 мин в инкубаторе микропланшетном при температуре (37,0 ± 1,0) °С.

3.4. Содержимое лунок аккуратно удалить в емкость с дезинфицирующим раствором используя автоматический микропланшетный вошер, планшет промыть 4 раза рабочим ПР, как указано в п.3.2.

3.5. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл СС или ТМБ – Субстратного раствора и планшет выдержать в течение 25 мин в защищённом от света месте при комнатной температуре.

3.6. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента, содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета и через 1-2 минуты провести учет результатов при основном фильтре 450 нм и референс-фильтре 620-680 нм, используя ридер. Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм.

Далее см. раздел **X.**

Схема проведения ИФА приведена в Приложении 2.

Постановка количественного анализа.

Количественный анализ следует проводить по результатам качественного анализа. Во все лунки планшета внести по 25 мкл БР.

В 3 лунки иммуносорбента дозатором пипеточным внести по 75 мкл К0, в 2 лунки по 75 мкл К1+, в 2 лунки по 75 мкл К2+, в 2 лунки по 75 мкл К3+, в 2 лунки по 75 мкл К4+, в 2 лунки по 75 мкл контрольной сыворотки. В оставшиеся лунки внести по 75 мкл анализируемых образцов. При этом содержимое лунок изменяет свой цвет с фиолетового на сине-зелёный. Каждый образец внести в две лунки планшета.

Последующие этапы анализа проводить в соответствии с **Процедурой 1 или Процедурой 2**.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении 2.

Постановка на автоматическом анализаторе

Проведение анализа в автоматическом режиме на автоматическом анализаторе типа «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN», Швейцария (возможна постановка на других ИФА - анализаторов открытого типа).

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

Таблица 3

Расход реагентов набора на один планшет при постановке ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Субстратная смесь	
	ПР (конц. х 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц. х 11) (мл)	РРК (мл)	СБ (мл)	ТМБ (мл)
12	48,0	до 1200,0	1,2	12,0	12,0	1,2

1. Задать программу проведения ИФА и включить анализатор.

2. Приготовленный рабочий промывочный раствор залить в предназначенную для него емкость (входящую в комплект к ИФА-анализатору). Флаконы с контрольными образцами (калибраторами) К1+, К2+, К3+, К4+, К0 и контрольной сывороткой а также флаконы или пробирки с исследуемыми образцами в объеме не менее 300 мкл установить в соответствующие штативы анализатора. В анализатор поместить необходимое количество планшетов. Далее постановку проводить в соответствии с инструкцией по применению ИФА-анализатора и программой проведения ИФА.

3. По окончании анализа прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов (калибраторов) К1+, К2+, К3+, К4+, К0 и контрольной сыворотки. Далее учет результатов проводить согласно разделу **IX**.

Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест-системы “ДС-ИФА-АНТИ-HBsAg” на автоматических ИФА-анализаторах:

1. Контроль внесения образца рекомендуется проводить при длине волны 620 нм, критерий: ОП > 0,380.

2. Контроль внесения конъюгата рекомендуется проводить при длине волны 620 нм, критерий: ОП > 0,588.

3. Контроль внесения СС рекомендуется проводить при длине волны 405 нм, критерий: ОП > 0,050.

X. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Результаты качественного анализа.

ОП крит. = Среднее значение ОП (К4+)

Исследуемые образцы расценивать как положительные: если ОП ≥ ОПкрит.

Исследуемые образцы расценивать как отрицательные: если ОП < ОПкрит.

(Такие образцы количественному анализу не подлежат).

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

2. Результаты количественного анализа.

Полученные результаты отношений ОП контрольных образцов (калибраторов) должны соответствовать следующим требованиям:

ОПср К1+ > ОПср К2+ > ОПср К3+ > ОПср К4+ > ОПср К0

Количество анти-HBsAg определить по графику, построенному на основании величин оптической плотности контрольных образцов.

На миллиметровой бумаге отложить на оси ординат (OY) средние значения величин оптической плотности контрольного отрицательного образца (калибратора 0) и контрольных положительных образцов (калибраторов 1- 4), на оси абсцисс (OX) – концентрацию анти-HBsAg в этих образцах, выраженную в мМЕ/мл. По полученным точкам провести калибровочную кривую.

В качестве примера на рис.1 приведена стандартная кривая, которая используется для определения концентрации анти-HBsAg по значениям ОП каждого контрольного положительного образца.

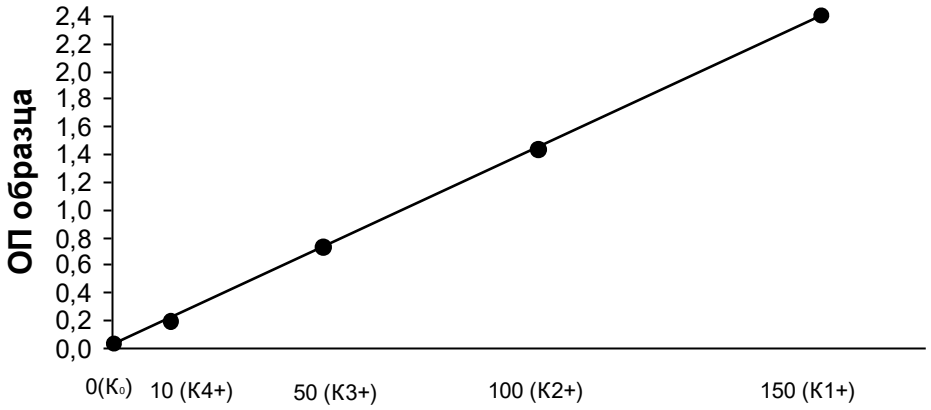


Рис.1 - Калибровочная кривая для определения концентрации анти-HBsAg в исследуемом образце

Для определения концентрации анти-HBsAg в исследуемом образце на оси ординат следует отметить среднее значение ОП анализируемого образца, провести прямую линию до пересечения с калибровочной кривой и из точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. Точка пересечения перпендикуляра с осью абсцисс будет соответствовать концентрации анти-HBsAg в исследуемом образце, выраженной в мМЕ/мл.

Если полученная концентрация анти-HBsAg в образце превышает 150 мМЕ/мл, то образец рекомендуется предварительно развести в 10 и более раз контрольным отрицательным образцом К0 (калибратором 0) - (90 мкл К0 и 10 мкл сыворотки (плазмы)) и анализировать повторно как цельный образец, учитывая при расчете фактор разведения.

Контрольная сыворотка служит для проверки достоверности полученных результатов. Если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации анти-HBsAg в контрольной сыворотке попадает в пределы указанные на этикетке флакона, значит, полученные величины концентраций анти-HBsAg в образцах считать достоверными.

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

XI. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности указан на упаковке набора. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Хранение - в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование - при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование от 9 до 20 °С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя – ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 603093, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.ru, www.npods.ru.

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

1. рекламационного набора;
2. всех образцов кроводач пациента;
3. протоколов исследований с использованием других методов с указанием серии, сроков годности;
4. протоколов исследований с использованием референтных тестов с указанием серии, сроков годности.

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

XII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

CE	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)	LOT	Номер партии (серии)
IVD	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)	+2°C +8°C	Температурные пределы хранения
	Производитель	EXP.	Срок годности число/месяц/год
REF	Каталожный номер		Использовать инструкцию по применению
Σ	Количество определений	Xi	Содержит раздражающее вещество

Дополнительная информация в соответствии с ГОСТ Р 51088-2013

- «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»».
- «Реагенты набора не содержат вредных веществ в опасных концентрациях, за исключением реагентов, обозначенных символом «Внимание». При попадании на кожу или слизистые немедленно промыть большим количеством воды».
- Расшифровка символов по ГОСТ Р 15223-1-2014 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Общие требования».

– Дата изготовления (YYYY-MM), символ 5.1.3;

– Срок годности (дата истечения срока годности в формате YYYY-MM-DD), символ 5.1.4;

– Не допускать воздействия солнечного света, символ 5.3.2;

– Беречь от влаги, символ 5.3.4;

– Внимание, символ 5.4.4;

Xi – Содержит раздражающее вещество (символ исключен).

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

Приложение 1

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность теста не более 2 мМЕ/мл. Оценка аналитической чувствительности выполнена согласно процедуре, рекомендованной NCCLS (EP 17-A).

Линейность

Зависимость концентрации анти-HBsAg в образцах сыворотки крови при разведении их К0 (калибратором 0) имеет линейный характер в диапазоне концентраций контрольных положительных образцов К1+ - К4+ (калибраторов 1-4). Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

Диагностическая чувствительность

При тестировании предварительно охарактеризованных в тесте сравнения анти-HBsAg позитивных образцов (210 образцов сыворотки крови) процент совпадения составил 100%. Диагностическая чувствительность (95% CI): 210/210=100% (98.2% - 100%).

Специфичность

Специфичность набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-HBsAg» определяли при тестировании предварительно охарактеризованных в тесте сравнения анти-HBsAg негативных образцов (n= 1141). Процент совпадения составил 99,82%. Специфичность (95% CI): 1139/1141=99.82% (99.36% - 99.95%).

Была протестирована панель, состоящая из:

- 510 образцов сывороток крови здоровых доноров;
- 206 образцов сывороток крови, взятых от беременных женщин;
- 210 образцов больных гепатитом С;
- 215 образцов сывороток крови пациентов с различными неинфекционными заболеваниями.

Результаты приведены в таблице 1

Таблица 1

Исследуемые категории	Количество образцов	Количество ложнопозитивных образцов	Специфичность, %	95% CI
Здоровые доноры	510	1	99,8	98,9% - 99,9%
Беременные женщины	206	0	100	98,17% -100%
Больные гепатитом С	210	0	100	98,2% - 100%
Пациенты с различными неинфекционными заболеваниями	215	1	99,53	97,41% -99,92%
Итого	1141	2	99,82	99,36% -99,95%

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

Точность

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» анти-HBsAg — соответствие измеренной концентрации анти-HBsAg предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и контрольного положительного образца №3. Процент открытия составляет от 90 до 110%.

Внутриплашечная воспроизводимость была оценена при тестировании 3 положительных образцов в 25 повторах в рамках одной серии. Коэффициент вариации составил не более 8 %

Внутрисерийная воспроизводимость анализа была оценена при тестировании 3 положительных образцов в 25 повторах на наборах реагентов одной и той же серии. Коэффициент вариации составил не более 8%.

Межсерийная воспроизводимость анализа была оценена при тестировании 3 положительных образцов в 25 повторах на наборах реагентов 3-х серий. Коэффициент вариации составил не более 8%.

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

Приложение 2

СХЕМА АНАЛИЗА

1	**Внести**	По 25 мкл БР	
2	**Внести**	По 75 мкл контрольных образцов	
3	**Внести**	По 75 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы)	
4	**Инкубировать**	**Процедура 1** 30 мин, термошейкер, (37,0 ± 1,0) °С, 500 об/мин	**Процедура 2** 60 мин, инкубатор микропланшетный, (37,0 ± 1,0) °С
5	**Промыть планшет**	Рабочий ПР, не менее 400 мкл, 4 раза	
6	**Внести**	По 100 мкл рабочего раствора конъюгата	
7	**Инкубировать**	**Процедура 1** 30 мин, термошейкер, (37,0 ± 1,0) °С, 500 об/мин	**Процедура 2** 30 мин, инкубатор микропланшетный, (37,0 ± 1,0) °С
8	**Промыть планшет**	Рабочий ПР, не менее 400 мкл, 4 раза	
9	**Внести**	По 100 мкл СС или ТМБ-Субстратного раствора	
10	**Инкубировать**	25 мин, комнатная температура, в защищенном от света месте	
11	**Внести**	По 150 мкл стоп-реагента	
11	**Учет результатов**	450 нм/620-680 нм или 450 нм	

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