REF **В-1254** Σ **96**

REF **В-1252** Σ **192**

REF **В-1255** Σ **480**

REF **В-1256** Σ **96 (для выявления)**
или
48 (для подтверждения)

И Н С Т Р У К Ц И Я
по применению

Набор реагентов «ДС-ИФА-HBsAg-0,01» Тест – система иммуноферментная для выявления или подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В, набор диагностический

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

Содержание

I. НАЗНАЧЕНИЕ 3
II. ПРИНЦИП ТЕСТА....3
III. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-HBsAg-0,01» 4
IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ....6
V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 6
VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ 7
VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ 8
VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ....8
IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ 8
X. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА 10
XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ....13
XII. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА....14
XIII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ 15
XIV. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ 15
Приложение 16

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

Набор реагентов выпускается в виде четырех комплектов.
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, так и для постановки на ИФА-анализаторах открытого типа с возможностью дробного использования.
Комплект 3 рассчитан на проведение 480 (пять разборных планшетов) определений, включая контрольные; предназначен как для ручной постановки, так и для постановки на ИФА-анализаторах открытого типа с возможностью дробного использования.
Комплект 4 – для выявления и/или подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В
рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений для выявления или 48 определений для подтверждения наличия HBsAg, включая контрольные, предназначен как для ручной постановки, так и для постановки на ИФА-анализаторах открытого типа с возможностью дробного использования (по одному стрипу – в случае выявления или по два стрипа – в случае подтверждения наличия HBsAg).

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-HBsAg-0,01» предназначен для выявления или подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке (плазме) и препаратах крови (альбумине, фибринолизине, лейкоцитарном интерфероне, иммуноглобулинах) методом иммуноферментного анализа. Возможно выявление и/или подтверждение реакцией нейтрализации как диких типов, так и мутантных вариантов поверхностного антигена вируса гепатита В.

Чувствительность набора при выявлении поверхностного антигена вируса гепатита В - 0,01 МЕ/мл.

II. ПРИНЦИП ТЕСТА

«ДС-ИФА-HBsAg-0,01» основан на твердофазном ИФА (одностадийный «сэндвич»-вариант). HBsAg в исследуемом образце одновременно связывается с антителами к HBsAg, сорбированными в лунках планшета, и с меченными биотином антителами к HBsAg. В данный комплекс включается стрептавидин, меченный пероксидазой хрена. Несвязавшиеся реагенты удаляются в ходе отмывки. После этого добавляется субстратный раствор на основе ТМБ. Реакция останавливается добавлением серной кислоты.

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

Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации HBsAg 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-1.

III. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-HBsAg-0,01»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска*			
	комплект 1 Σ **96**	комплект 2 Σ **192**	комплект 3 Σ **480**	комплект 4 Σ **96**
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 планшетов	1 планшет
Конъюгат-1 (концентрат×11) - антитела к HBsAg (анти-HBs), конъюгированные с биотином. Прозрачная или слегка опалесцирующая фиолетового цвета жидкость.	1 флакон 1,4 мл	1 флакон 1,4 мл	1 флакон 3,5 мл	1 флакон 1,4 мл
Конъюгат-2 (концентрат×11) - стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая голубого цвета жидкость.	1 флакон 1,4 мл	1 флакон 1,4 мл	1 флакон 3,5 мл	1 флакон 1,4 мл
РРК-1 (раствор для разведения Конъюгата-1) - непрозрачная зеленого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при встряхивании.	1 флакон 14,0 мл	1 флакон 14,0 мл	2 флакона по 18,0 мл	1 флакон 14,0 мл
РРК-2 (раствор для разведения Конъюгата-2) - прозрачная желтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при встряхивании.	1 флакон 14,0 мл	1 флакон 14,0 мл	2 флакона по 18,0 мл	1 флакон 14,0 мл
$К_1$+ (контрольный положительный образец) – инактивированный. 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, с концентрацией HBsAg (0,02 ± 0,01) МЕ/мл. **$К_2$+** - лиофилизированный, сухая пористая аморфная масса белого или светло-желтого цвета. **или** **$К_2$+** - жидкий, готовый к применению, **о**палесцирующая 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	1 флакон **или** 1 флакон 2,5 мл
К- (контрольный отрицательный образец) – инактивированный. Прозрачная или опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 4,5 мл	1 флакон 2,5 мл

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

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	1 флакон 120,0 мл	2 флакона по 120,0 мл	1 флакон 50,0 мл
Стоп-реагент - раствор серной кислоты. Прозрачная, бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл	1 флакон 50,0 мл	2 флакона по 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор, готовый к применению. Прозрачная бесцветная жидкость. **или** **СБ** - субстратный буферный раствор, цитратный буфер, содержащий раствор перекиси водорода. Прозрачная бесцветная жидкость. **ТМБ** (хромоген) - раствор, содержащий 3,3′,5,5′-тетраметилбензидин. Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон 14,0 мл **или** 1 флакон 25,0 мл 1 флакон 2,5 мл	1 флакон 25,0 мл **или** 1 флакон 25,0 мл 1 флакон 2,5 мл	1 флакон 60,0 мл **или** 2 флакона по 50,0 мл 2 флакона по 3,5 мл	1 флакон 14,0 мл **или** 1 флакон 25,0 мл 1 флакон 2,5 мл
АНТИ-HBs-ПЛЮС (нейтрализующий реагент) – инактивированный, козьи антитела, содержащие антитела к HBsAg. Прозрачная розового цвета жидкость.	-	-	-	1 флакон 2,0 мл
АНТИ-HBs-МИНУС (контрольный реагент) – инактивированный, козьи антитела, не содержащие антитела к HBsAg. Прозрачная голубого цвета жидкость.	-	-	-	1 флакон 2,0 мл

**базовая комплектация*

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами. Имеется цветовая кодировка реагентов, а также маркировка посредством штрих-кодов. Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают инструкцию по применению.

Допускается изменение базовой комплектации набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объем), при этом количество каждого реагента набора должно быть достаточным для проведения ИФА.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная плёнка для ИФА-планшетов	1 шт.	2 шт.	3 шт.	1 шт.
		3 шт.	6 шт.	15 шт.	3 шт.
	Одноразовые наконечники	16 шт.	32 шт.	80 шт.	16 шт.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.	4 шт.	10 шт.	2 шт.
	Пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или пакет полиэтиленовый с замком Zip-Lock	1 шт.	2 шт.	3 шт.	1 шт.

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

IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность оценивалась при тестировании образцов 453 пациентов с острым и хроническим гепатитом В, образцы были протестированы с помощью набора реагентов «ДС-ИФА-HBsAg-0,01». Чувствительность набора по позитивным образцам составляет 100%.

Аналитическая чувствительность оценивалась с использованием «Второго международного стандарта для HBsAg субтипа adw2, генотипа А» (NIBSC, Великобритания, код 00/588).

Уровень чувствительности тест-системы при детекции поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) составляет 0,01 МЕ/мл.

Специфичность оценивалась по результатам внешних исследований на случайной выборке образцов сывороток крови доноров в количестве 5348 и составила 99,8% (95%Cl: (99,63-99,89).

V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. 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 использовании по назначению вероятность негативного воздействия на организм незначительна. Растворы в объёмах и концентрациях, представленных в наборе, не представляют опасности при вдыхании.

Меры первой помощи (при необходимости): При попадании на кожу/в глаза – промыть большим количеством воды. Загрязненную одежду снять. При необходимости обратиться за медицинской помощью.

5.4. Паспорт безопасности набора реагентов может быть представлен по запросу клиента.

5.5. Достоверность результатов зависит от выполнения следующих правил лабораторной практики:

- ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой (18-25) °С;
- 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.

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

<table>
<tr>
<td rowspan="4"></td>
<td rowspan="4">• Не изменять процедуру проведения анализа.
• Не использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
• Не проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли.
• Тщательно промывать лабораторную посуду.
• Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
• Не использовать одну и ту же ванночку для внесения Конъюгатов и ТМБ-Субстратного раствора.
• Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной (деионизированной). Многоразовые ванночки для автоматических анализаторов 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.
• Не допускать контакта металлических предметов с растворами Конъюгатов, субстратов или ТМБ-Субстратного раствора.
• Соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполнены, не допускать остатка жидкости в лунках после промывки.
• Использовать валидированные пипетки и оборудование, новые наконечники для каждого образца.
• Не подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света во время инкубации и хранения.</td>
<td></td>
<td>• Сыворотки крови, используемые при приготовлении К-, К$_1$+, К$_2$+, АНТИ-HBs-ПЛЮС и АНТИ-HBs-МИНУС не содержат HBsAg, антиген p24 ВИЧ-1 и антител к ВИЧ-1, 2 и вирусу гепатита С.
• При работе с реагентами набора (К-, К$_1$+, К$_2$+, АНТИ-HBs-ПЛЮС, АНТИ-HBs-МИНУС) и исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>• В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>• При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами использовать спецодежду и одноразовые перчатки.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>• Не пипетировать ртом.
• Промывать руки после работы с набором реагентов и исследуемыми образцами
• Избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, субстратного буфера, хромогена, Стоп-реагента с кожей и слизистыми.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td colspan="3">• При расплескивании образцов немедленно дезинфицировать поверхность 3% раствором хлорамина Б.
• Отходы, содержащие биологические образцы, нужно нейтрализовать до сброса в канализацию. Твердые отходы 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, остатки проб, растворов) обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или другого хлорсодержащего средства. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.</td>
</tr>
</table>

VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

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, МУ 287-113).

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

VII. 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;
- Наконечники одноразовые для пипеток переменного объема;
- Инкубатор микропланшетный (термостат) или термостатируемый шейкер – (42,0 ± 1,0) °С или (37,0 ± 1,0) °С;
- Устройство для промывания планшетов (вошер);
- Микропланшетный ридер (анализатор иммунологический) (фильтры 450 нм и 620-680 нм);
- Бумага фильтровальная лабораторная;
- Перчатки медицинские;
- Для постановки ИФА в автоматическом режиме – любая модель ИФА-анализаторов открытого типа.

VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови проводить в соответствии с текущей практикой методом венопункции. Для анализа использовать неразведенную сыворотку\плазму. 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, 2-8 °С).

Жидкие препараты крови исследовать неразведенными; 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 20 °С (замораживание\оттаивание не более 3 раз). Во избежание осаждения фибрина плазму размораживать в течение нескольких минут при температуре (39,0 ± 1,0) °С на водяной бане.

IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:

- **Иммуносорбент.** Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет и вынуть планшет.

- **К-, $К_1$+, $К_2$+ (при комплектации набора жидким $К_2$+), РРК-1, РРК-2, АНТИ-HBs-ПЛЮС, АНТИ-HBs-МИНУС, Стоп-реагент (0,2 моль/л), ТМБ-Субстратный раствор (при комплектации набора ТМБ-Субстратным раствором).**

Перед использованием флаконы с реагентами перемешать, не допуская вспенивания.

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

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

• **Рабочий промывочный раствор (ПР).** Содержимое флакона с концентратом ПР (х25) тщательно перемешать. Необходимый объем концентрата развести в 25 раз соответствующим объемом воды дистиллированной или деионизированной (см. табл. № 2 и 3) и тщательно перемешать. Хранить в чистой плотно закрытой емкости не более 14 сут. при температуре от 18 до 25 °С или не более 28 сут. при температуре от 2 до 8 °С.

• **Рабочий раствор Конъюгата-1.** Концентрат Конъюгата-1 развести в 11 раз раствором РРК-1 (см. табл. 2 и 3), осторожно перемешать, не допуская вспенивания. Хранить не более 12 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 25 °С.

• **Рабочий раствор Конъюгата-2.** Концентрат Конъюгата-2 развести в 11 раз раствором РРК-2 (см. табл. 2 и 3), осторожно перемешать, не допуская вспенивания. Хранить не более 12 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 25 °С.

• **Контрольный слабоположительный образец ($К_2$+) (при комплектации набора лиофилизированным $К_2$+).** Содержимое флакона растворить в объеме воды дистиллированной или деионизированной, указанном на этикетке. Осторожно перемешать и выдержать до использования 5-10 мин. Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С.

• **Субстратная смесь (СС).** Концентрат ТМБ развести в 11 раз раствором СБ и тщательно перемешать. Хранить не более 10 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 25 °С в химически чистых флаконах или специальной емкости, предназначенной для постановки ИФА на автоматических анализаторах.

Таблица 2

Расход реагентов набора при ручной постановке ИФА

Количество используемых стрипов/лунок		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**1 лунка**
Рабочий ПР	ПР (х 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	0,2
	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	4,8
Рабочий раствор Конъюгата-1,2	Конъюгат-1,2 (х 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	0,005
	РРК-1,2, 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	0,05
СС	ТМБ, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	0,01
	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	0,1

3. Хранение неиспользованных реагентов:

После вскрытия флаконов оставшиеся не использованными жидкие компоненты набора плотно закрыть винтовыми крышками и хранить в упаковке производителя в течении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

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

После вскрытия неиспользованные стрипы Иммуносорбента без рамки поместить в фольгированный пакет (не удаляя силикагель!) и тщательно герметизировать. Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета, или поместить фольгированный пакет со стрипами в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock.

После первого вскрытия пакета Иммуносорбент стабилен в течение срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С, при условии соблюдения герметизации.

X. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед использованием набор выдержать 30 мин при комнатной температуре.

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

Проведение ИФА при ручной постановке:

Процедура / Этап	**Процедура 1**	**Процедура 2**	**Процедура 3**	**Процедура 4**
1	Внести в лунки планшета 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 $К_2$+.			
1.1.	**Для постановки подтверждающего теста** Внести в лунки планшета по 100 мкл контрольных и исследуемых образцов. 2 стрипа: 4 лунки - К-, 3 лунки - $К_1$+, 1 лунка - $К_2$+. 3 стрипа и более: 5 лунок - К-, 3 лунки - $К_1$+, 2 лунки - $К_2$+*. *$К_2$+ используют для контроля чувствительности тест-системы. При дробном использовании планшета достаточно однократной постановки $К_2$+. В остальные лунки внести по 100 мкл повторно реактивных образцов, каждый образец внести в 2 лунки планшета. В одну лунку с К-, $К_1$+ и каждым исследуемым образцом внести АНТИ-HBs-МИНУС. В другую лунку с К-, $К_1$+ и каждым исследуемым образцом внести АНТИ-HBs-ПЛЮС. АНТИ-HBs-МИНУС и АНТИ-HBs-ПЛЮС внести по 25 мкл в лунки Иммуносорбента.			

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

<table>
<tr><td rowspan="2">2</td><td colspan="2">Планшет покрыть крышкой или защитной плёнкой и выдержать в термостате:</td><td colspan="2" rowspan="2">См. пункт 3.</td></tr>
<tr><td>30 мин
(42,0 ± 1,0) °С</td><td>60 мин
(37,0 ± 1,0) °С</td></tr>
<tr><td>3</td><td colspan="4">Не удаляя содержимое лунок и не промывая планшет, во все лунки внести пипеткой по 50 мкл рабочего раствора Конъюгата-1. При этом, содержимое лунок изменяет свой цвет с зеленого на серый. Допускается изменение цвета раствора в лунке на ярко-желтый, если тестируемый образец имеет кислое значение pH.
При добавлении Конъюгата-1 не допускать заноса образца из одной лунки в другую через наконечники. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета.</td></tr>
<tr><td rowspan="2">4</td><td colspan="2">Планшет покрыть крышкой или защитной плёнкой и выдержать в термостате:</td><td colspan="2">Планшет без крышки или защитной плёнки выдержать в термошейкере при 500 об/мин:</td></tr>
<tr><td>45 мин
(42,0 ± 1,0) °С.</td><td>60 мин
(37,0 ± 1,0) °С.</td><td>40 мин
(42,0 ± 1,0) °С.</td><td>60 мин
(37,0 ± 1,0) °С.</td></tr>
<tr><td>5</td><td colspan="4">Не удаляя содержимое лунок и не промывая планшет, во все лунки внести пипеткой по 50 мкл рабочего раствора Конъюгата-2.
При добавлении Конъюгата-2 не допускать заноса образца из одной лунки в другую через наконечники. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета.</td></tr>
<tr><td rowspan="2">6</td><td colspan="2">Планшет покрыть крышкой или защитной плёнкой и выдержать в термостате:</td><td colspan="2">Планшет без крышки или защитной плёнки выдержать в термошейкере при 500 об/мин:</td></tr>
<tr><td>45 мин
(42,0 ± 1,0) °С.</td><td>30 мин
(37,0 ± 1,0) °С.</td><td>20 мин
(42,0 ± 1,0) °С.</td><td>30 мин
(37,0 ± 1,0) °С.</td></tr>
<tr><td>7</td><td colspan="4">С помощью промывочного устройства удалить содержимое лунок и промыть планшет 4 раза рабочим раствором ПР. Для этого осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета до краев (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек, затем удалить в емкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использовать автоматический микропланшетный вошер. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа. Удалить остатки влаги путем отстукивания по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.</td></tr>
<tr><td>8</td><td colspan="4">Во все лунки внести по 100 мкл субстратной смеси или готового к применению ТМБ-Субстратного раствора. Планшет выдержать 20 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С.</td></tr>
<tr><td>9</td><td colspan="4">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.
При комплектации набора готовым к применению ТМБ-Субстратным раствором учет результатов можно проводить в течение 10 минут.</td></tr>
</table>

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

Примечание: При тестировании альбуминов рекомендуется использовать процедуру – термостатируемый шейкер, (42,0 ± 1,0) °С. Чувствительность набора при выявлении поверхностного антигена вируса гепатита В в альбуминах – 0,02 МЕ/мл.

Проведение ИФА в автоматическом режиме.

Таблица 3

Расход реагентов набора при постановке ИФА на автоматических анализаторах

Количество используемых стрипов		**4** (только для комплекта № 1)	**8** (только для комплекта № 1)	**12** (целый планшет)
Рабочий ПР	ПР (х 25), мл	16,0	32,0	40,0
	Вода, мл	384,0	768,0	960,0
Рабочий раствор Конъюгата	Конъюгат-1,2 (х 11) , мл	0,45	0,70	0,70
	РРК-1,2, мл	4,5	7,0	7,0
СС	ТМБ, мл	0,7	1,2	1,2
	СБ, мл	7,0	12,0	12,0

- Включить анализатор и провести подготовку к работе согласно инструкции по эксплуатации анализатора**.
- Загрузить в анализатор компоненты тест-системы (планшеты, контрольные образцы, рабочие растворы в специальных контейнерах или емкостях).
- Загрузить в анализатор исследуемые образцы (не менее 300 мкл).
- Запустить программу проведения ИФА, адаптированную для данной тест-системы.
- По окончании анализа прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов $К_1$+, $К_2$+ и К-.
- Результаты анализа учитывать, если значение ОП в лунке с контрольным положительным образцом ($К_1$+) не менее 0,6, а среднее значение в лунках с контрольным отрицательным образцом (К-) не более 0,12. Далее учет результатов проводить согласно разделу XI.

**при отсутствии в программе промывающего устройства стандартных опций, таких как придонная и перекрёстная аспирация, регулировка позиций донной аспирации, скорости промывки и силы потока наливаемой жидкости, времени замачивания и времени аспирации, а также скорости встряхивания, во избежание получения не корректных результатов, допускается введение в процедуру дополнительной отмывки планшета.

- Далее учет результатов проводить аналогично раздела XI.

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

Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест-системы «ДС-ИФА-HBsAg-0,01» на автоматических ИФА-анализаторах:

- Контроль внесения образца рекомендуется проводить при длине волны 450 нм, критерий: ОП > 0,125.
- Контроль внесения Конъюгата-1 рекомендуется проводить при длине волны 620 нм, критерий: ОП > 0,265.
- Контроль внесения Конъюгата-2 рекомендуется проводить при длине волны 405 нм, критерий: ОП > 1,200.

XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты анализа учитывать, если значение ОП в лунке с $К_1$+ не менее 0,6, а среднее значение в лунках с К- не более 0,12. Если одно из значений ОП К- выходит за этот предел, его следует исключить из расчета среднего значения. Если исключению подлежат более одного значения ОП К-, то анализ следует повторить. $К_2$+ должен давать положительную реакцию.

ОПкрит. рассчитывается по формуле:

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

где А – 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 данного набора***.

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

Первичнопозитивные образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках. Если величина ОП образца в обеих лунках меньше ОП крит., то проба расценивается как негативная по HBsAg. 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.

*** «Для серии № 091XXX величина коэффициента А=0,060»

Для подтверждающего теста

Оценку валидности проведения теста по ОП К-, $К_1$+ и $К_2$+ проводить как описано выше. Значения ОП в лунках с К- после внесения АНТИ-HBs-МИНУС и АНТИ-HBs-ПЛЮС должны быть ниже ОПкрит.

В подтверждающем тесте присутствие поверхностного антигена 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:

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

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

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%.

Образец считается положительным, если показатель нейтрализации ≥ 50%.

Образцы с ОП ≥ 1,0 могут не подвергаться нейтрализации в цельном виде. Рекомендуется такие образцы развести в 100 раз и более (до ОП < 1,0) рабочим раствором ПР и снова провести подтверждающий анализ.

Если после разведения образца ОПк ≥ ОПкрит. и показатель нейтрализации ≥ 50%, то образец признают положительным, содержащим HBsAg (результат подтверждается).

Если после разведения образца ОПк ≥ ОПкрит., а показатель нейтрализации меньше 50%, то образец признают отрицательным, не содержащим HBsAg (результат не подтверждается).

Если после разведения образца ОПк < ОПкрит., то образец признают отрицательным, не содержащим HBsAg (результат не подтверждается).

XII.ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

- Не использовать для анализа образцы термоинактивированные, консервированные азидом натрия, образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией[1].

  [1] *Образцы, содержащие не более 25 мг/л билирубина, образцы с гиперлипердемией, содержащие не более 20 г/л в пересчёте на триглицериды, и образцы с гемолизом, содержащие не более 10 г/л гемоглобина, не оказывают влияния на результат.*
- Влияние антикоагулянтов (цитрата, гепарина, ЭДТА) на результаты тестирования образцов установлено не было.
- Заключение о реактивности образцов к HBsAg 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.
- Для высокочувствительных тест-систем существует риск неспецифических реакций, что может привести к ложноположительным результатам.
- Отрицательные результаты могут быть получены, если количество маркера в образце ниже уровня чувствительности теста, или если маркер отсутствует на той стадии заболевания, когда был отобран образец.
- Для определения окончательного диагноза заболевания необходимо дополнительное тестирование на маркеры вируса гепатита В.
- Положительный результат на HBsAg не исключает возможность ко-инфекции другими вирусами.
- Данная тест-система была разработана и исследована на индивидуальных сыворотках (плазмах) больных/доноров. Нельзя использовать объединенные образцы, поскольку точность таких результатов не исследовалась.

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

XIII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности 24 месяца.

Срок годности серии 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 и хранение при температуре до 25 °С 10 суток и до 30 °С 5 суток. Замораживание не допускается.

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. 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.

XIV. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель	+2°C +8°C	Температурный диапазон
REF	Номер по каталогу		Не допускать воздействия солнечного света
Σ	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов (количество определений)		Беречь от влаги
LOT	Код партии (номер серии)		Внимание
	Дата изготовления (YYYY-MM)		Вверх
	Срок годности (дата истечения срока годности в формате YYYY-MM-DD)		Хрупкое, обращаться осторожно

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

СХЕМА АНАЛИЗА

1	**Внести**	По 100 мкл К-, $К_1$+, $К_2$+
2	**Внести**	По 100 мкл исследуемых образцов
3	**Внести**	По 25 мкл АНТИ-HBs-ПЛЮС, АНТИ-HBs-МИНУС (п. 3 выполнять только при использовании комплекта 4)
4	**Инкубировать**	**Процедура 1:** 30 мин, (42,0 ± 1,0) °С, инкубатор микропланшетный **Процедура 2:** 60 мин, (37,0 ± 1,0) °С, инкубатор микропланшетный (не применять п. 4 при использовании Процедуры 3, Процедуры 4)
5	**Внести**	По 50 мкл рабочего раствора Конъюгата-1
6	**Инкубировать**	**Процедура 1:** 45 мин, (42,0 ± 1,0) °С, инкубатор микропланшетный **Процедура 2:** 60 мин, (37,0 ± 1,0) °С, инкубатор микропланшетный **Процедура 3:** 40 мин, (42,0 ± 1,0) °С, 500 об/мин, термошейкер **Процедура 4:** 60 мин, (37,0 ± 1,0) °С, 500 об/мин, термошейкер
7	**Внести**	По 50 мкл рабочего раствора Конъюгата-2
8	**Инкубировать**	**Процедура 1:** 45 мин, (42,0 ± 1,0) °С, инкубатор микропланшетный **Процедура 2:** 30 мин, (37,0 ± 1,0) °С, инкубатор микропланшетный **Процедура 3:** 20 мин, (42,0 ± 1,0) °С, 500 об/мин, термошейкер **Процедура 4:** 30 мин, (37,0 ± 1,0) °С, 500 об/мин, термошейкер
9	**Промыть планшет**	Рабочий ПР, не менее **380 мкл**, **4 раза**
10	**Внести**	По 100 мкл СС или ТМБ-Субстратного раствора (в зависимости от комплектации)
11	**Инкубировать**	20 мин, 18-25 °С в защищенном от света месте
12	**Внести**	По 150 мкл Стоп-реагента
13	**Учет результатов**	450 нм/620-680 нм или 450 нм

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