

УТВЕРЖДАЮ

ГЕН ДИРЕКТОР ПОЛЫНЦЕВ Д.А.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Медицинского изделия для диагностики *in vitro*
Набора реагентов для
качественного иммуноферментного определения
поверхностного антигена вируса гепатита В
в сыворотке, плазме и препаратах крови человека
«ГепатитИФА-НВsAg сенс»
по ТУ 21.20.23-278-98539446-2018

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор «ГепатитИФА-НВsAg сенс» предназначен для качественного иммуноферментного определения поверхностного антигена вируса гепатита В (НВsAg) в сыворотке, плазме крови (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль гепарина, К₂ЭДТА, К₃ЭДТА) и препаратах (иммуноглобулин, альбумин, лейкоцитарный интерферон, криопреципитат), приготовленных из крови человека (далее по тексту – препараты крови).

1.2. Гепатит В – инфекционное заболевание печени вирусной этиологии, характеризующееся или бессимптомным течением острой формы, или наличием симптомов острого поражения печени и интоксикации (с желтухой или без нее). У

некоторых людей гепатит В переходит в хроническую форму, которая впоследствии может развиваться в цирроз или первичный рак печени.

Возбудителем гепатита В является ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Hepadnaviridae*, род *Orthohepadnavirus*. Выделяют 10 генотипов вируса с различными биологическими свойствами. Один из четырех генов генома вируса гепатита В (ВГВ) кодирует поверхностный антиген (НВsAg), представляющий собой гликозилированный белок оболочки. НВsAg содержит детерминанту «а», общую для всех субтипов вируса, и дополнительные субдетерминанты (d и y), определяющие иммунологические различия подгрупп (ad и ay). Инкубационный период составляет от 45 до 180 дней, в среднем – 75 дней. Основные источники ВГВ – носители вируса, больные острой и хронической формой вируса (ВГВ содержится в крови, слюне, желчи, половых секретах и др.). Возможные пути заражения: перинатальное инфицирование, при половых контактах и парентеральным путем.

Главным средством для профилактики гепатита В является высокоэффективная вакцина.

1.3.Функциональное назначение набора «ГепатитИФА-НВsAg сенс» – скрининг поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке и плазме крови человека, в том числе при обследовании доноров крови, и препаратах крови человека (иммуноглобулин, альбумин, лейкоцитарный интерферон, криопреципитат).

1.4.Набор «ГепатитИФА-НВsAg сенс» предназначен для однократного применения.

1.5.Набор «ГепатитИФА-НВsAg сенс» предназначен для клинической лабораторной диагностики *in vitro* сотрудниками

клинико-диагностических лабораторий медицинских учреждений и лабораторий службы крови.

1.6. Набор «ГепатитИФА-HBsAg сенс» предназначен для обследования всех групп населения без градации по демографическому или популяционному признаку.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ГепатитИФА-HBsAg сенс» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к HBsAg, а также конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (конъюгат 2). Одно из моноклональных антител иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе - конъюгировано с эфиром биотина (конъюгат 1). Во время первой инкубации одновременно происходит иммобилизация HBsAg, содержащегося в исследуемом образце, и связывание образовавшегося комплекса с конъюгатом 1. Во время второй инкубации конъюгат 2 связывается с биотинилированными антителами. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой (Рисунок 1).

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству HBsAg в исследуемых пробах. Наличие HBsAg оценивается относительно значения ОПкрит.

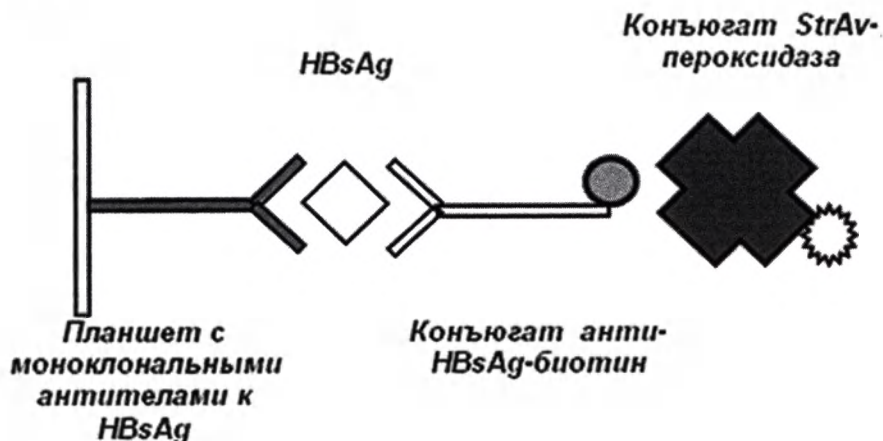


Рисунок 1. Схема анализа

2.2. Состав и комплектации набора

Набор «ГепатитИФА-HBsAg сенс» выпускается в четырех комплектациях:

Комплектация №1: на 96 определений при проведении анализа вручную или на автоматическом анализаторе «Alisei Q.S.»¹, SEAC/Next Level, Италия (далее «Alisei»).

Комплектация №2: на 192 определения при проведении анализа вручную или на автоматическом анализаторе «Alisei».

Комплектация №3: на 480 определений при проведении анализа вручную или на автоматическом анализаторе «Alisei».

Комплектация №4: на 960 определений при проведении анализа вручную или на автоматическом анализаторе «Alisei».

¹Допускается постановка анализа на других автоматических анализаторах для ИФА открытого типа, за информацией о необходимой комплектации набора и программе проведения анализа обращайтесь к производителю набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс» в ООО «Компания Алкор Био», тел/факс: 8(812) 677-8779.

Обратите внимание, при каждой постановке анализа на **каждом планшете** обязательно нужно определять: оптические плотности (ОП) отрицательной контрольной пробы (ОКП), слабоположительной контрольной пробы (СКП), положительной контрольной пробы (ПКП) и раствора ТМБ в соответствии со схемой маркировки лунок (п.7.2.1.1.).

Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение шести месяцев после вскрытия компонентов набора.

В состав набора входят следующие компоненты:

- комплект из двенадцати 8-луночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к HBsAg» – 1, 2, 5 или 10 упаковок в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- отрицательная контрольная проба на основе водно-солевого раствора, не содержащая рекомбинантный HBsAg. Флаконы маркированы «Отрицательная контрольная проба» – 1, 2, 5 или 10 флаконов (по 2 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- слабоположительная контрольная проба на основе водно-солевого раствора, содержащая рекомбинантный HBsAg в низкой концентрации. Флаконы маркированы «Слабоположительная контрольная проба» – 1, 2, 5 или 10 флаконов (по 1,5 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- положительная контрольная проба на основе водно-солевого раствора, содержащая рекомбинантный НВsAg в высокой концентрации. Флаконы маркированы «Положительная контрольная проба» – 1, 2, 5 или 10 флаконов (по 1,5 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- конъюгат моноклональных антител к НВsAg с биотином, маркирован «Конъюгат Е1» – 1, 2, 5 или 10 флаконов (по 6 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- концентрированный конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, маркирован «Конъюгат Е2 (10Х)» – 1, 2, 5 или 10 флаконов (по 1 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- водно-солевой раствор для разведения Конъюгата Е2, маркирован «Буфер Е2» – 1, 3 или 5 флаконов (по 15 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- водно-солевой раствор для разведения препаратов крови, маркирован «Буфер Д сенс» – 1 флакон (6мл) или 1, 2 флакона (по 15 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Н (20Х)» – 1, 2 флакона (по 50 мл) или 3, 5 флаконов (по 100 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- раствор тетраметилбензидина, содержащий тетраметилбензидин, перекись водорода и стабилизаторы, маркирован «Раствор ТМБ» – 1, 2, 5 или 10 флаконов (по 14 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- стоп-реагент, 3,59% раствор соляной кислоты, маркирован «Стоп-реагент» – 2, 3 (по 50 мл) или 3, 6 флаконов

(по 100 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- одноразовая ванночка – 2 шт для комплектаций №1, №2 или 4 шт для комплектаций №3, №4 (Таблица 1);
 - одноразовый наконечник – 16 шт для комплектаций №1, №2 или 32 шт для комплектаций №3, №4 (Таблица 1);
 - пакет закрывающийся полиэтиленовый (при упаковке стрипов в пакет из материала пленочного) – 1, 2, 5 или 10 шт в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
2. Паспорт на набор реагентов – 1 шт;
3. Инструкция по применению – 1 шт.

Таблица 1

Кат. номер		200-68	200-69	200-70	200-71
Название компонента	Цветовая кодировка компонента	Комплектация №1	Комплектация №2	Комплектация №3	Комплектация №4
Комплект стрипов в рамке	-	1 шт	2 шт	5 шт	10 шт
Отрицательная контрольная проба (ОКП)	Жидкость желтого цвета	1 фл – 2 мл	2 фл по 2 мл	5 фл по 2 мл	10 фл по 2 мл
Слабоположительная контрольная проба (СКП)	Жидкость розового цвета	1 фл – 1,5 мл	2 фл по 1,5 мл	5 фл по 1,5 мл	10 фл по 1,5 мл
Положительная контрольная проба (ПКП)	Жидкость красного цвета	1 фл – 1,5 мл	2 фл по 1,5 мл	5 фл по 1,5 мл	10 фл по 1,5 мл
Конъюгат E1	Жидкость зеленого цвета	1 фл – 6 мл	2 фл по 6 мл	5 фл по 6 мл	10 фл по 6 мл
Конъюгат E2 (10X)	Жидкость темно-розового цвета	1 фл – 1 мл	2 фл по 1 мл	5 фл по 1 мл	10 фл по 1 мл
Водно-солевой раствор для разведения Конъюгата E2 (Буфер E2)	Жидкость темно-розового цвета	1 фл – 15 мл	1 фл – 15 мл	3 фл по 15 мл	5 фл по 15 мл

Водно-солевой раствор для разведения препаратов крови (Буфер Д сенс)	Жидкость желтого цвета	1 фл – 6 мл	1 фл – 6 мл	1 фл – 15 мл	2 фл по 15 мл
Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (Буфер Н (20X))	Бесцветная жидкость	1 фл – 50 мл	2 фл по 50 мл	3 фл по 100 мл	5 фл по 100 мл
Раствор ТМБ	Бесцветная или бледно-желтого цвета, или светло-бурого цвета жидкость	1 фл - 14 мл	2 фл по 14 мл	5 фл по 14 мл	10 фл по 14 мл
Стоп-реагент	Бесцветная жидкость	2 фл по 50 мл	3 фл по 50 мл	3 фл по 100 мл	6 фл по 100 мл
Одноразовая ванночка	-	2 шт	2 шт	4 шт	4 шт
Одноразовый наконечник	-	16 шт	16 шт	32 шт	32 шт
Пакет закрывающийся полиэтиленовый	-	1 шт	2 шт	5 шт	10 шт
Паспорт на набор реагентов	-	1 шт	1 шт	1 шт	1 шт
Инструкция по применению	-	1 шт	1 шт	1 шт	1 шт

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс» (порог обнаружения HBsAg) определяется как статус разведения Третьего международного стандарта «WHO International Standard. Third International Standard for HBsAg» производства NIBSC, с минимальной концентрацией HBsAg. Набор «ГепатитИФА-HBsAg сенс» определяет разведение международного

стандарта с концентрацией 0,01 МЕ/мл как положительный образец.

3.2. Диагностическая чувствительность

Чувствительность набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс» по Стандартной панели предприятия HBsAg (СПП HBsAg) из образцов сыворотки, плазмы и препаратов крови человека, содержащих и не содержащих HBsAg, определяется, как доля полученных положительных результатов к общему количеству положительных образцов в СПП HBsAg и составляет 100%.

Установлено, что Набор «ГепатитИФА-HBsAg сенс» определяет все образцы «HBsAg-стандартной панели сывороток», РУ № ФСЗ 2012/13718, производства АО «Вектор Бест» как положительные образцы.

Исследование диагностической чувствительности было проведено на выборке из 463 образцов сыворотки, плазмы с антикоагулянтами, полученных от пациентов с подтвержденным гепатитом В в острой и хронической формах и препаратов крови, котаминированных положительной сывороткой крови.

Из них:

- 427 образцов, с доказанным наличием HBsAg в т.ч. образцы последовательной сдачи крови, слабopоложительные образцы, образцы с известной высокой концентрацией аналита, образцы, содержащие разные генотипы ВГВ (А-Е,Н), свежие образцы (взяты в день исследования) сыворотки и плазмы крови.

- 20 образцов, полученных от пациентов с подтвержденной микст-инфекцией (гепатит С + гепатит В) и (ВИЧ-инфекция + гепатит В).

- 16 образцов препаратов крови (альбумин, интерферон, иммуноглобулин, криопреципитат), контаминированных положительной сывороткой крови.

Диагностическая чувствительность набора «ГепатитИФА-НВsAg сенс» на данной выборке образцов составила 100%, доверительный интервал с 95% доверительной вероятностью составил 99,36%-100%.

Статистическая достоверность диагностической чувствительности для каждого вида биологического материала составила:

Клинический материал	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%)
Сыворотка крови человека	98,72-100%
Плазма крови человека (К2ЭДТА, К3ЭДТА, цитрат натрия 3,2%, гепарин)	98,60-100%
Препараты крови (альбумин, интерферон, иммуноглобулин, криопреципитат), контаминированные положительной сывороткой крови.	83,05-100%

Статистическая достоверность диагностической чувствительности для разных исследуемых групп составила:

Исследуемая группа	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%)
Пациенты с выявленным заболеванием, вызванным вирусом гепата В	99,3-100%
Пациенты с подтвержденной микст-инфекцией	86,0-100%

3.3. Аналитическая специфичность набора «ГепатитИФА-НВsAg сенс» определяется как способность теста обнаруживать только НВsAg, в присутствии интерферирующих факторов в исследуемом материале.

Наличие антикоагулянтов (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль гепарина, К₂ЭДТА, К₃ЭДТА) в

пробах не оказывает негативного воздействия на результаты анализа с помощью набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс».

Повышение концентрации гемоглобина до 5 мг/мл, билирубина до 0,1 мг/мл, сывороточного альбумина до 50 мг/мл или триглицеридов до 15 мг/мл в некоторых пробах не оказывает негативного воздействия на результаты анализа с помощью набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс», но не следует использовать гемолизированные или мутные образцы.

Аналитическая специфичность по Панелям предприятия для определения аналитической специфичности, аттестованных по СОП, составляет 100%.

Наличие перекрёстных реакций в образцах, полученных от беременных женщин, от пациентов с подтверждённым гепатитом А, гепатитом С, цитомегаловирусом, вирусом простого герпеса, вирусом ветряной оспы, сифилисом, вирусом Эпштейна-Барр, токсоплазмой (IgM), вирусом краснухи (IgG), от ВИЧ-инфицированных пациентов, от пациентов с невирусной болезнью печени, с системной красной волчанкой и от пациентов, в чьих пробах обнаружен ревматоидный фактор, не выявлено.

3.4. Диагностическая специфичность

Специфичность набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс» по Стандартной панели предприятия HBsAg (СПП HBsAg) из образцов сыворотки, плазмы и препаратов крови человека, содержащих и не содержащих HBsAg, СПП HBsAg, определяется как доля полученных отрицательных результатов к общему количеству отрицательных образцов в СПП HBsAg и составляет 100%.

Исследование диагностической специфичности было проведено на выборке из 5599 образцов сыворотки и плазмы

и препаратов крови человека, не содержащих поверхностный антиген вируса гепатита В.

Из них:

- 157 потенциально перекрестно-реагирующих образца, полученных от беременных женщин, от пациентов с подтверждённым гепатитом А, гепатитом С, цитомегаловирусом, вирусом простого герпеса, вирусом ветряной оспы, сифилисом, вирусом Эпштейна-Барр, токсоплазмой (IgM), вирусом краснухи (IgG), от ВИЧ-инфицированных пациентов, от пациентов с невирусной болезнью печени, с системной красной волчанкой и от пациентов, в чьих пробах обнаружен ревматоидный фактор);

- 4800 образцов, полученных от условно здоровых пациентов, подлежащих плановому профилактическому обследованию;

- 181 образец, полученный от доноров крови;

- 426 образцов. Полученных от пациентов с неинфекционными заболеваниями и пациентов, проходящих процедуру гемодиализа;

- 35 образцов препаратов крови (альбумин, иммуноглобулин, лейкоцитарный интерферон, криопреципитат).

Диагностическая специфичность набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс» на данной выборке образцов составила 99,91%, доверительный интервал с 95% доверительной вероятностью составил 99,87-99,92%.

Статистическая достоверность диагностической специфичности для каждого вида биологического материала составила:

Клинический материал	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%)
Сыворотка крови человека	99,89-99,99%
Плазма крови человека (К2ЭДТА, К3ЭДТА, цитрат натрия 3,2%, гепарин)	99,77-100%
Препараты крови (альбумин, иммуноглобулин, лейкоцитарный интерферон, криопреципитат)	91,9-100%

Статистическая достоверность диагностической специфичности для разных исследуемых групп составила:

Исследуемая группа	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%)
Условно здоровые пациенты, подлежащие плановому профилактическому обследованию	99,80-99,98%
Доноры крови	98,5-100%
Пациенты с неинфекционными заболеваниями и диализные пациенты	99,4-100%
Пациенты в крови которых обнаружен потенциально перекрестно-реагирующий фактор.	98,2-100%

3.5. Коэффициент вариации оптической плотности² в одном и том же образце при определении HBsAg с использованием набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс» не превышает 8%. Внутрисерийная воспроизводимость не превышает 8%. Межсерийная воспроизводимость не превышает 8%.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций

В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины сигнала от концентрации становится

² При измерении на одном и том же оборудовании, либо оборудовании со схожими техническими характеристиками.

обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс» хук-эффект высоких концентраций HBsAg не обнаружен вплоть до концентрации HBsAg 1 000 000 МЕ/мл.

3.7. Ограничение теста

Пробы пациентов, принимавших накануне сдачи крови лекарственные средства, витамин В₇ (биотин), употреблявших алкоголь, соленую, жирную и острую пищу, для анализа с помощью набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс» использовать не рекомендуется.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 3 (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ №4н от 06.06.2012 г.).

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2333-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Набор предназначен для профессионального применения персоналом, имеющим квалификацию для выполнения диагностических исследований *in vitro* после специального образования и обучения. Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием (врач КДЛ, биолог, медицинский технолог).

4.4. Перед началом работы ознакомиться с инструкцией и применять набор строго по назначению.

4.5. Стоп-реагент представляет собой 3,59% раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.6. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, разрешенные к применению на территории РФ, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

4.7. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно. Поскольку ИФА чувствителен к ионам металлов, контакт металлических предметов с компонентами набора недопустим.

4.8. Для обработки посуды и оборудования рекомендуется использовать дезинфицирующие средства, изготовленные на основе третичных аминов, четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) или спиртов и разрешенные к применению на территории РФ. Использование дезинфицирующих средств на основе активного кислорода и хлора возможно лишь на предстерилизационном этапе, с последующей термической стерилизацией.

4.9. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.10. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.11. Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4.12. Все использованные одноразовые материалы и остатки образцов должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.13. После использования стрипы, контрольные или калибровочные пробы, образцы и все расходные материалы, которые контактировали с образцами во время обработки, хранения или анализа (флаконы, перчатки, наконечники и т.д.) должны собираться отдельно и стерилизоваться в автоклаве с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10. Вместо автоклавирования наконечники могут быть стерилизованы дезинфицирующим средством, после утилизированы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

4.14. Во время процедуры ручной промывки планшета содержимое лунок необходимо выбрасывать в контейнер с дезинфицирующим раствором на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов.

4.15. Не использовать набор по истечении срока годности.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 450 нм и 600-655 нм³;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37...42°C³;
- автоматическое промывочное устройство (вошер) для иммунологических планшетов^{3,4};
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными одноразовыми наконечниками⁵ с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 20–200 мкл; на 100–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными одноразовыми наконечниками⁵, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

³Допускается использование автоматических анализаторов для ИФА открытого типа с аналогичными характеристиками, за информацией о необходимой комплектации набора и программе проведения анализа обращайтесь к производителю набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс» в ООО «Компания Алкор Био», тел/факс: (812) 677-8779.

⁴При использовании автоматического промывочного устройства необходимо тщательно следить за его состоянием, периодически проверять емкости и соединительные шланги для промывочных буферов на наличие микробиологического зароста и других загрязнений, проводить техническое обслуживание в соответствии с рекомендациями производителя оборудования.

⁵Повторное использование наконечников не допускается. При внесении каждого образца необходимо использовать новый наконечник.

- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 100-1000 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная или очищенная деионизованная⁶;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- дезинфицирующий раствор на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

Дополнительно для проведения анализа в термостате:

- термостат³, поддерживающий температуру +37°C.

Дополнительно для проведения анализа на анализаторе «Alisei»:

- автоматический иммуноферментный анализатор «Alisei»³;
- многоцелевые полипропиленовые пробирки⁷ 12x75 вместимостью 5 мл;
- концентрированный водный раствор Триала, 5000-кратный концентрат, маркирован «Триал»⁷.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Эквивалентность образцов сыворотки и плазмы крови человека, содержащих антикоагулянты (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль гепарина, K₂ЭДТА, K₃ЭДТА), подтверждена не менее чем на 25 положительных и 25 отрицательных образцах каждого вида

⁶В соответствии с ГОСТ 6709-72 «Вода дистиллированная. Технические условия» необходимо периодически контролировать качество воды, используемой для приготовления растворов.

⁷Компоненты, не входящие в состав набора, поставляются по отдельному заказу.

биоматериала в анализе с помощью набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс».

Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в пробирку, содержащую антикоагулянт (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль гепарина, K_2 ЭДТА, K_3 ЭДТА). После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или мутную сыворотку и плазму, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре $+2...8^{\circ}C$ не более 5-ти суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре $-20^{\circ}C$ и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

6.4. Препараты крови хранить в соответствии с инструкцией по применению данного препарата. Лиофильно высушенные препараты крови перед использованием в тест-системе разводить в соответствии с инструкцией по применению данного препарата.

Непосредственно перед анализом необходимое количество препарата крови развести Буфером Д сенс в 2 раза.

Например: 150 мкл препарата крови + 150 мкл буфера Д сенс. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

Разведенные препараты крови не хранить.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) (далее КТ) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Контрольные пробы готовы к использованию.

7.1.3. Конъюгат Е1 готов к использованию.

7.1.4. Буфер Е2 готов к использованию.

7.1.5. Конъюгат Е2. **Непосредственно перед анализом** необходимое количество Конъюгата Е2 (10Х) развести Буфером Е2 в 10 раз.

Например: 200 мкл Конъюгата Е2 (10Х) + 1,8 мл Буфера Е2. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.6. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Н (20Х) развести дистиллированной или очищенной деионизованной водой в 20 раз.

Например: 50 мл буфера Н (20Х) + 950 мл воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.7. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию.

7.1.8. Стоп-реагент готов к использованию.

7.1.9. Рабочий раствор Триала. Необходимое количество концентрированного раствора Триала развести дистиллированной или очищенной деионизованной водой в 5000 раз.

Например: 1 мл Триала + 4999 мл воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.10. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до КТ.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Ручная постановка

На странице 32 приведена схема проведения анализа.

7.2.1.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом⁸:

A1 – № 1 - для измерения величины ОП раствора ТМБ⁹;

A2, B1, B2 – № 2 - для измерения величины ОП ОКП;

C1, C2 – № 3 - для измерения величины ОП СКП;

D1, D2 – № 4 - для измерения величины ОП ПКП.

Примечание: Рекомендовано проведение анализа в дубликатах, это позволяет уменьшить вероятность ошибок и получить достоверные результаты. Допускается использование набора для анализа образцов в монопликатах при условии своевременной поверки и обслуживания измерительного и промывочного оборудования, что позволяет в случае неисправности свести к минимуму их негативное влияние на результат анализа.

7.2.1.2. Внести во все лунки, кроме A1, по 25 мкл конъюгата E1.

7.2.1.3. Внести в соответствующие лунки по 100 мкл контрольных проб, в оставшиеся лунки – по 100 мкл исследуемых образцов.

Примечание: В наборе «ГепатитИФА-НВsAg сенс» общее время внесения контрольных проб и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации различных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.1.4. Инкубировать стрипы. Возможны 2 варианта инкубации:

⁸ Допускается внесение ОКП в дубликатах, СКП и ПКП – в монопликатах.

⁹ При настройке спектрофотометра «по воздуху» допускается не проводить измерение ОП раствора ТМБ.

- **Инкубирование стрипов в течение 40 минут с шейкированием в термостатируемом шейкере при температуре +37...42°C со скоростью 400–800 об/мин;**

- **Инкубирование стрипов в течение 80 мин в термостате при температуре +37°C без шейкирования (предварительно встряхнуть рамку аккуратным простукиванием в течение 20-30 сек или на шейкере в течение 5-10 секунд при комнатной температуре);**

7.2.1.5. По окончании первой инкубации без промывки и не удаляя содержимого лунок во все лунки, кроме А1, немедленно внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата Е2, приготовленного по п.7.1.5.

7.2.1.6. Инкубировать стрипы. Возможны 2 варианта инкубации:

- **Инкубирование стрипов в течение 20 минут с шейкированием в термостатируемом шейкере при температуре +37...42°C со скоростью 400–800 об/мин;**

- **Инкубирование стрипов в течение 20 мин в термостате при температуре +37°C без шейкирования (предварительно встряхнуть рамку аккуратным простукиванием в течение 20-30 секунд или на шейкере в течение 5-10 секунд при комнатной температуре).**

Примечание: *Инкубацию №2 следует проводить в условиях аналогичных инкубации №1 (с шейкированием или без шейкирования).*

7.2.1.7. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов и промыть лунки 8 раз. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п.7.1.6., выдержать в течение 30 секунд

с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства. При автоматической промывке необходимо заполнять лунки полностью и следить за качеством аспирации.

7.2.1.8. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ и инкубировать стрипы. Возможны 2 варианта инкубации с ТМБ:

- Инкубирование стрипов в темноте в течение 15 минут с шейкированием в термостатируемом шейкере при температуре $+37...42^{\circ}\text{C}$ со скоростью 400-800 об/мин.

- Инкубирование стрипов в темноте в течение 30 минут без шейкирования при КТ.

Примечание: При проведении основных инкубаций в термостате инкубацию с ТМБ следует проводить только в течение 30 минут в темноте без шейкирования при КТ.

7.2.1.9. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхнуть рамку аккуратным постукиванием в течение 20-30 секунд или на шейкере в течение 5-10 секунд при комнатной температуре.

7.2.1.10. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.1.9., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при КТ.

7.2.2. Постановка на анализаторе «Alisei»

Анализатор «Alisei» имеет полностью

автоматизированный процесс проведения анализа: внесение реагентов, инкубирование, промывка, измерение оптической плотности, обработка результатов. Программа «ГепатитИФА-HBsAg сенс» введена в память анализатора.

7.2.2.1. При каждой постановке анализа на каждой планшете обязательно нужно определять: ОП ОКП, СКП, ПКП.

7.2.2.2. В случае дробного применения набора необходимо извлечь контрольные пробы из автоматического анализатора после их внесения в лунки всех планшетов, участвующих в постановке, и, плотно закрыв крышками, убрать в холодильник. Не допускается повторное использование контрольных проб, находившихся на борту анализатора в течение всей сессии, вне зависимости от ее длительности. Остальные жидкие реагенты убрать в холодильник сразу по окончании сессии. Эти ограничения обусловлены естественным испарением жидкостей, приводящим к получению некорректных результатов измерения при последующем использовании реагентов.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. После выполнения ручной постановки измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм, рекомендуется использование референсного фильтра 600-655 нм.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** ОП, полученную на референсном фильтре, из ОП, полученной при 450 нм, для каждой лунки.

Необходимо вычитать ОП, полученную в лунке с ТМБ (после вычитания ее ОП на референсном фильтре) из значений ОП всех остальных лунок.

Примечание: Значение ОП в лунке с ТМБ не должно превышать 0,09 ед. ОП. Допускается настройка спектрофотометра «по воздуху».

8.2. Критерии достоверности анализа

Результаты анализа считают достоверными при соблюдении следующих условий:

- среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих ОКП, должно быть не более 0,2 ед.ОП;
- среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих СКП, должно быть не менее 0,4 ед.ОП;
- среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих ПКП, должно быть не менее 2,0 ед.ОП.

В случае, если полученные данные выходят за пределы указанных значений, результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ (только для ручной постановки)

9.1. Определить значение ОП_{крит.}, для чего к среднему значению ОП ОКП¹⁰ прибавить К_{крит.}

К_{крит.} – коэффициент, определяемый на предприятии-изготовителе и указанный в паспорте.

$$\text{ОП}_{\text{крит.}} = \text{ОП}_{\text{окп}} + \text{К}_{\text{крит.}}$$

9.2. Сравнить значение ОП каждого исследуемого образца со значением ОП_{крит.}

10. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если значение ОП образца меньше ОП_{крит.}, то считают, что исследуемый образец не содержит НВsAg.

¹⁰ Для расчета среднего значения ОП ОКП использовать только те значения, которые удовлетворяют критерию достоверности. В случае если два значения ОП из трех не удовлетворяют критерию, анализ следует повторить.

Если значение ОП образца **больше или равно ОПкрит.**, то образец должен быть проанализирован в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий» для элиминации ложноположительных результатов.

Следует учитывать, что при отсутствии инфекции существует вероятность получения ложноположительного результата, например, у людей, недавно вакцинированных от гепатита В, под воздействием принимаемых лекарственных средств, при аутоиммунных заболеваниях, при беременности или при доброкачественных/злокачественных трансформациях клеток и т.п.

При наличии инфекции существует вероятность получения ложноотрицательного результата, например, у пациентов на гемодиализе. Ни один из известных методов тестирования не дает полной гарантии отсутствия инфекции.

Исключения случайной ошибки добиваются перестановкой в дубликатах. Для прослеживания динамики заболевания образцы крови, полученные от одного пациента, например, с интервалом 2 – 3 недели, должны тестироваться одновременно (в одной постановке). Для получения корректных данных при сравнительной оценке рекомендуется алиquotировать образцы крови и хранить в соответствии с п. 6.3. Перед проведением анализа аликвоту вынуть из морозильной камеры, дать нагреться до комнатной температуры, тщательно перемешать и отцентрифугировать.

В силу разнообразия используемого сырья, широкого спектра иммунологических реакций в образцах пациентов, тесты разных производителей могут давать различающиеся результаты для одних и тех же проб. Результаты, полученные в разное время, в разных лабораториях или при использовании тест-систем разных производителей, не могут

сравниваться количественно, а только по диагнозу (т.е., как положительные или отрицательные).

Основанием для постановки диагноза не может служить результат единичной постановки. Диагноз устанавливается по совокупности клинических и лабораторных данных.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1. Набор «ГепатитИФА-HBsAg сенс» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

Срок годности набора — 18 месяцев.

11.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час, но не менее, чем за 30 минут до проведения анализа.

11.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить в пакет с этикеткой, затем в пакет закрывающийся полиэтиленовый и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;

- контрольные пробы, буфер Д сенс, конъюгат Е1, концентрированный конъюгат Е2, раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 6 месяцев;

- буфер Е2, стоп-реагент, концентрированные водно-солевой раствор для промывки лунок и раствор Триала после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;

- рабочий раствор конъюгата Е2, подготовленный к использованию, хранить закрытым в темном месте при КТ не более 12 часов;

- водно-солевой раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым при КТ не более 5 суток или при температуре +2...8°C не более 4 недель;

- раствор Триала, подготовленный к использованию, хранить закрытым при КТ не более 5-ти суток.

11.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- для каждого независимого анализа необходимо определение ОП ОКП, СКП, ПКП;

- запрещается возвращать избыток конъюгата Е1, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;

- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения;

- запрещается повторное использование контрольных проб, находившихся на борту анализатора в течение всей сессии, вне зависимости от ее длительности.

11.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящих в состав данного набора реагентов.

Запрещается смешивать растворы ТМБ с различными буквенными обозначениями в сериях.

11.6. Запрещается использовать промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

11.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

11.8. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

11.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

11.10. Таблица расхода реагентов (при постановке ИФА вручную)

Количество используемых стрипов	Конъюгат Е1, мл	Конъюгат Е2 (1Х рабочий раствор), мл		Промывочный раствор		Раст-вор ТМБ, мл	Стоп-реагент, мл
		Конъюгат Е2 (10Х), мл	Буфер Е2, мл	Буфер Н (20Х), мл	Дистиллированная или очищенная деионизованная вода, мл		
2	1,0	0,13	1,17	8	до 160	2,3	2,3
3	1,5	0,20	1,80	12	до 240	3,5	3,5
4	2,0	0,27	2,43	16	до 320	4,7	4,7
5	2,5	0,33	2,97	20	до 400	5,8	5,8
6	3,0	0,40	3,60	24	до 480	7,0	7,0
7	3,5	0,47	4,23	28	до 560	8,2	8,2
8	4,0	0,53	4,77	32	до 640	9,3	9,3
9	4,5	0,60	5,40	36	до 720	10,5	10,5
10	5,0	0,67	6,03	40	до 800	11,7	11,7
11	5,5	0,73	6,57	44	до 880	12,8	12,8
12	6,0	0,80	7,20	50	до 1000	14,0	14,0

12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

12.1. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$.

Транспортирование изделий при температурах $+2...8^{\circ}\text{C}$ должно производиться в ёмкостях или при помощи холодильных установок, обеспечивающих регламентированный температурный режим.

Допускается транспортирование набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 15 суток, в том числе при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ не более 1 суток.

12.2. Набор, транспортированный с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

13. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

13.1. При утилизации наборы с истекшим сроком годности должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами в соответствии с требованиями МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

13.2. При использовании набора образуются отходы классов А, В и Г, которые утилизируются в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

14. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам качества набора «ГепатитИФА-НВsAg сенс» обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный проспект, д. 40 лит. А, тел/факс: 8(812) 677-8779.

Бесплатный телефон по России: 8-800-234-37-79.

15. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ЭТИКЕТКАХ

	Только для <i>in vitro</i> диагностики		Количество тестов
	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Номер серии		Срок годности
	Производитель		Хранить при
	Дата изготовления		Биологический риск
	Ознакомьтесь с инструкцией		Беречь от влаги

Инструкция разработана в соответствии с ТУ 21.20.23-278-98539446-2018.

Примечания к Схеме проведения анализа (стр. 32):

КП – контрольные пробы;

ОП – оптическая плотность;

КТ – комнатная температура (+18...25°C);

ПО – программное обеспечение.

«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



Варнавичус П.К.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА (только для ручной постановки)

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания	
1	Внесение реагентов	25 мкл Конъюгата Е1	КТ (+18...+25°C)	Внесение КП и исследуемых образцов не более 15'	В лунку для определения ОП ТМБ ничего не вносить	
2		100 мкл КП				
3		100 мкл исследуемых образцов				
4	Инкубация №1	—	+37...42°C	40'	по выбору	Термостатируемый шейкер, 400–800 об/мин
			+37°C	80'		Перед инкубацией перемешать. Термостат, без шейкирования
5	Внесение конъюгата	50 мкл Конъюгата Е2 (1X)			В лунку для определения ОП ТМБ Конъюгат Е2 не вносить	
6	Инкубация №2	—	+37...42°C	20'	от условий инкубации №1	Термостатируемый шейкер, 400 – 800 об/мин
			+37°C			Перед инкубацией перемешать. Термостат, без шейкирования
7	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывоч-ного раствора (8 раз)			1*промывочный раствор = = 50 мл буфера Н (20X) + 950 мл Н ₂ О	
8	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			Во все лунки	
9	Инкубация с ТМБ	—	+37...42°C	15'	от условий инкубаций №№ 1, 2	Только при проведении инкубаций в термостатируемом шейкере Термостатируемый шейкер 400-800 об/мин
			КТ	30'		При любых условиях инкубации В темноте
10	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента				
11	Перемешивание		КТ	20-30"	по выбору	Постукивание рамки
				5-10"		Шейкер
12	Регистрация результатов			В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 и 600-655 нм	
13	результатов				Калькулятор, соответствующее ПО	

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 33 (Индустри) лист а

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Д.Г. Полинцев

