

УТВЕРЖДАЮ
ГЕН ДИРЕКТОР ПОЛЫНЦЕВ ДТ



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Медицинского изделия для диагностики *in vitro*
Набор реагентов для иммуноферментного
подтверждения наличия **поверхностного антигена вируса**
гепатита В в сыворотке, плазме и препаратах крови

человека

«ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий»
по ТУ 21.20.23-527-98539446-2019

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий» предназначен для иммуноферментного подтверждения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В (чувствительность 0,01 МЕ/мл) в сыворотке, плазме крови (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль гепарина, K₂ЭДТА, K₃ЭДТА) и препаратах (иммуноглобулин, альбумин, лейкоцитарный интерферон, криопреципитат), приготовленных из крови человека (далее по тексту – препараты крови). Образцы, давшие положительный результат в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg сенс» производства ООО «Компания Алкор Био», рекомендуется проверить в реакции нейтрализации специфическими антителами в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий». Подтверждение наличия HBsAg в сыворотке, плазме и препаратах крови служит для элиминации ложноположительных результатов.

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 (HBsAg), представляющий собой гликозилированный белок оболочки. HBsAg 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-HBsAg сенс подтверждающий» – диагностика гепатита В. Показания к применению: подтверждение наличия поверхностного антигена вируса гепатита В

(чувствительность 0,01 МЕ/мл) 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-HBsAg сенс подтверждающий» предназначен для однократного применения.

1.5. Набор «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий» предназначен для клинической лабораторной диагностики *in vitro* сотрудниками клинико-диагностических лабораторий медицинских учреждений и лабораторий службы крови.

1.6. Набор «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий» 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 подтверждающий» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа, дополненный инкубацией с контрольным или нейтрализующим буфером. Образцы вносят в стрипы с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg, при этом в одну лунку добавляют контрольный буфер, не содержащий специфических антител, а в другую – нейтрализующий буфер, содержащий специфические антитела к HBsAg, затем добавляют конъюгат моноклональных АТ к HBsAg с эфиром биотина (конъюгат 1), и конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (конъюгат 2).

Если в образце присутствует HBsAg, во время инкубации в лунках с нейтрализующим буфером происходит связывание HBsAg со специфическими антителами из нейтрализующего буфера, в лунках с контрольным буфером HBsAg остается «свободным». Таким образом, при инкубации с нейтрализующим буфером доступный HBsAg, способный образовывать комплексы с моноклональными антителами твердой фазы и с конъюгатами 1 и 2, присутствует в меньшем количестве, чем при инкубации с контрольным буфером (Рисунок 1).

При отсутствии HBsAg в образце формирование иммунных комплексов со специфическими антителами нейтрализующего буфера, равно как и в контрольном буфере, не происходит.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. После измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках вычисляется коэффициент нейтрализации. Если коэффициент нейтрализации больше или равен 50%, то присутствие HBsAg в образце считают подтвержденным, если же меньше 50% - то образец признается отрицательным.

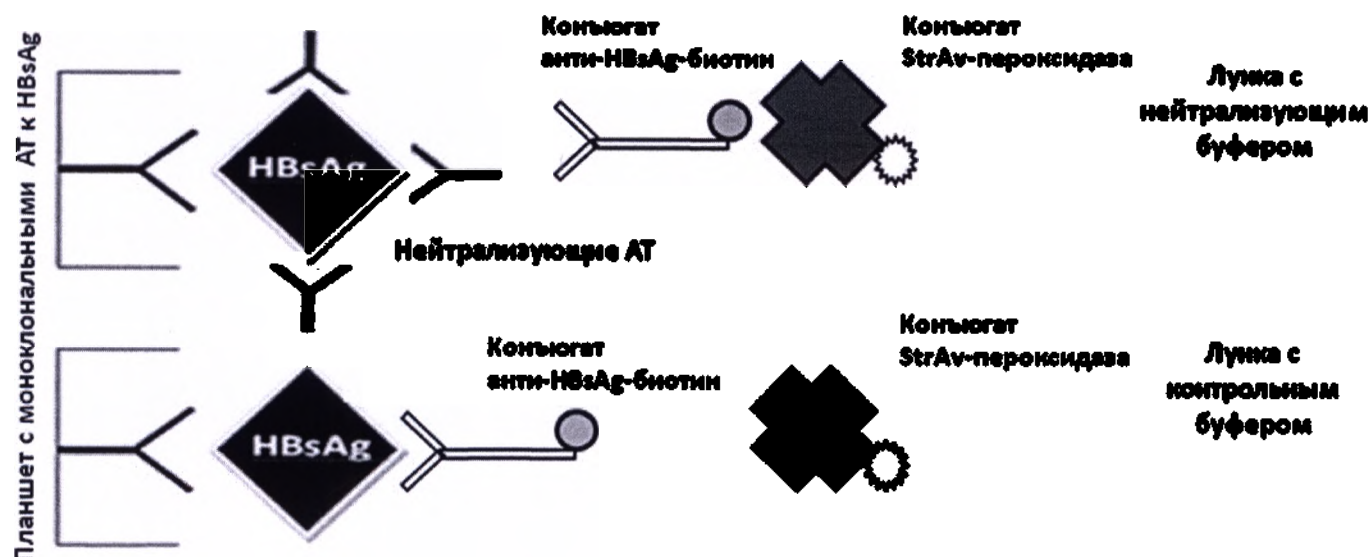


Рисунок 1. Схема анализа

2.2. Состав и комплектация набора

Набор «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий» выпускается в одной комплектации на 48 определений при проведении анализа вручную или на автоматическом анализаторе «Alisei Q.S.»¹, SEAC/Next Level, Италия (далее «Alisei»).

Обратите внимание, при каждой постановке анализа обязательно нужно определять: ОП, полученные для отрицательной контрольной пробы (ОКП), слабopоложительной контрольной пробы (СКП) и положительной контрольной пробы (ПКП), в лунках с контрольным буфером, ОП 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.

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 подтверждающий» в ООО «Компания Алкор Био», тел/факс: 8(812) 677-8779.

Состав набора:

- комплект из двенадцати 8-луночных стрипов в рамке с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к HBsAg» – 1 упаковка;
- отрицательная контрольная проба на основе водно-солевого раствора, не содержащая рекомбинантный HBsAg. Флакон маркирован «Отрицательная контрольная проба» – 1 флакон (2 мл);
- слабоположительная контрольная проба на основе водно-солевого раствора, содержащая рекомбинантный HBsAg в низкой концентрации. Флакон маркирован «Слабоположительная контрольная проба» – 1 флакон (1,5 мл);
- положительная контрольная проба на основе водно-солевого раствора, содержащая рекомбинантный HBsAg в высокой концентрации. Флакон маркирован «Положительная контрольная проба» – 1 флакон (1,5 мл);
- контрольный буфер на основе водно-солевого раствора, содержащий суммарные IgG. Флакон маркирован «Контрольный буфер» – 1 флакон (2,5 мл);
- нейтрализующий буфер на основе водно-солевого раствора, содержащий поликлональные антитела к HBsAg, маркирован «Нейтрализующий буфер» – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к HBsAg с биотином, маркирован «Конъюгат Е1» – 1 флакон (6 мл);
- концентрированный конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, маркирован «Конъюгат Е2 (10X)» – 1 флакон (1 мл);

- водно-солевой раствор для разведения Конъюгата E2, маркирован «Буфер E2» – 1 флакон (15 мл);
- водно-солевой раствор для разведения образцов, маркирован «Буфер Д сенс» – 1 флакон (50 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Н (20X)» – 1 флакон (50 мл);
- раствор тетраметилбензидина, содержащий тетраметилбензидин, перекись водорода и стабилизаторы, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, 3,59% раствор соляной кислоты, маркирован «Стоп-реагент» – 2 флакона (по 50 мл);
- одноразовая ванночка – 2 шт;
- одноразовый наконечник – 16 шт;
- пакет закрывающийся полиэтиленовый (при упаковке стрипов в пакет из материала пленочного) – 1 шт.

Таблица 1

Кат. номер		200-80
Название компонента	Цветовая кодировка компонента	
Комплект стрипов в рамке	-	1 шт
Отрицательная контрольная проба (ОКП)	Жидкость желтого цвета	1 фл – 2 мл
Слабоположительная контрольная проба (СКП)	Жидкость розового цвета	1 фл – 1,5 мл
Положительная контрольная проба (ПКП)	Жидкость красного цвета	1 фл – 1,5 мл
Контрольный буфер	Бесцветная жидкость	1 фл – 2,5 мл
Нейтрализующий буфер	Жидкость фиолетового цвета	1 фл – 2,5 мл
Конъюгат E1	Жидкость зеленого цвета	1 фл – 6 мл
Конъюгат E2 (10X)	Жидкость темно-розового цвета	1 фл – 1 мл
Водно-солевой раствор для разведения Конъюгата E2 (Буфер E2)	Жидкость темно-розового цвета	1 фл – 15 мл

Водно-солевой раствор для разведения образцов (Буфер Д сенс)	Жидкость желтого цвета	1 фл – 50 мл
Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (Буфер Н (20Х))	Бесцветная жидкость	1 фл – 50 мл
Раствор ТМБ	Бесцветная или бледно-желтого цвета, или светло-бурого цвета жидкость	1 фл – 14 мл
Стоп-реагент	Бесцветная жидкость	2 фл по 50 мл
Одноразовая ванночка	-	2 шт
Одноразовый наконечник	-	16 шт
Пакет закрывающийся полиэтиленовый	-	1 шт

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность (порог обнаружения НВsAg). Определяется как подтверждение положительного статуса разведения Третьего международного стандарта «WHO International Standard. Third International Standard for НВsAg» производства NIBSC, с минимальной концентрацией НВsAg. Набор «ГепатитИФА-НВsAg сенс подтверждающий» подтверждает положительный диагноз образца с концентрацией 0,01 МЕ/мл.

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

Установлено, что Набор «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий» подтверждает все образцы «HBsAg-стандартной панели сывороток», РУ № ФСЗ 2012/13718, производства АО «Вектор Бест» как положительные образцы, включая различные сероварианты HBsAg (ayw2, adw2, ayw3varA, ayw3varB, adrq+), а также мутантные формы HBsAg с аминокислотными заменами в S-гене в положении 145 (G145R), 134 (T134P) и 143 (S143L).

Исследование диагностической чувствительности было проведено на выборке из 358 образцов сыворотки, плазмы с антикоагулянтами и препаратов крови, полученных от пациентов с подтвержденным гепатитом В в острой и хронической формах.

Из них:

- 342 образца сыворотки и плазмы с антикоагулянтами с доказанным наличием HBsAg, в т.ч. образцы последовательной сдачи крови, слабоположительные образцы, образцы с известной высокой концентрацией анализата, образцы, содержащие разные генотипы ВГВ (А-Г), образцы, полученные от пациентов с подтвержденной микст-инфекцией (гепатит С + гепатит В и ВИЧ-инфекция + гепатит В), свежие образцы (взяты в день исследования) сыворотки и плазмы крови.

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

Диагностическая чувствительность набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий» на данной выборке образцов составила 100%, доверительный

интервал с 95% доверительной вероятностью составил 99,17%-100%.

Статистическая достоверность диагностической чувствительности для каждого вида биологического материала составила:

Клинический материал	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%)
Сыворотка крови человека	98,63-100%
Плазма крови человека (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль гепарина, K ₂ ЭДТА, K ₃ ЭДТА)	97,63-100%
Препараты крови (альбумин, лейкоцитарный интерферон, иммуноглобулин, криопреципитат), контаминированные положительной сывороткой крови.	82,93-100%

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

Исследование диагностической специфичности было проведено на выборке из 119 образцов сыворотки, плазмы и препаратов крови человека, не содержащих поверхностный антиген вируса гепатита В.

Из них:

- 50 потенциально перекрестно-реагирующих образцов, 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), краснухой (IgG), от ВИЧ-

инфицированных пациентов, от пациентов с невирусной болезнью печени, с системной красной волчанкой и от пациентов, в чьих пробах обнаружен ревматоидный фактор);

- 10 образцов с ложноположительными результатами, полученными при использовании набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс» (производства ООО «Компания Алкор Био», Россия);

- 50 образцов, полученных от доноров крови;

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

Диагностическая специфичность набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий» на данной выборке образцов составила 100%, доверительный интервал с 95% доверительной вероятностью составил 97,51-100%.

Статистическая достоверность диагностической специфичности для каждого вида биологического материала составила:

Клинический материал	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%)
Сыворотка крови человека	95,87-100%
Плазма крови человека (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль гепарина, K ₂ ЭДТА, K ₃ ЭДТА)	92,61-100%
Препараты крови (альбумин, иммуноглобулин, лейкоцитарный интерферон, криопреципитат)	71,69-100%

3.4. Аналитическая специфичность набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий» определяется как способность теста обнаруживать только HBsAg в присутствии интерферирующих факторов в исследуемом материале.

Наличие антикоагулянтов (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль гепарина, K₂ЭДТА, K₃ЭДТА) в пробах не оказывает негативного воздействия на результаты анализа с помощью набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий».

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 подтверждающий», 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), вирус 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.

3.5. Коэффициент вариации коэффициента нейтрализации² в одном и том же образце при определении HBsAg в одной сессии с использованием набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий» не превышает

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

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 обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ГепатитИФА-HBsAg сенс подтверждающий» 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 подтверждающий» 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 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производ.

4.12. Все использованные одноразовые материалы и остатки образцов должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.13. После использования стрипы, контрольные 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 2.1.3684-21. Вместо автоклавирования наконечники могут быть стерилизованы дезинфицирующим средством, после утилизированы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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, 405 нм и 600-655 нм³;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре +37 ...42°C³;
- автоматическое промывочное устройство (вошер) для иммунологических планшетов^{3,4};
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками⁵ с изменяемым объемом отбора

³ Допускается 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-НВsAg сенс подтверждающий» в ООО «Компания Алкор Био», тел/факс: (812) 677-8779.

⁴ При 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.

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

жидкостей: на 5–50 мкл; на 20–200 мкл; на 100–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;

- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками⁵, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

- 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 на анализаторе «Alisei»:

- автоматический иммуноферментный анализатор «Alisei»³;

- многоцелевые полипропиленовые пробирки⁷ 12x75 вместимостью 5 мл;

- концентрированный водный раствор Триала, 5000-кратный концентрат, маркирован «Триал (5000X)»⁷.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Эквивалентность образцов сыворотки и плазмы крови человека, содержащих антикоагулянты (цитрат натрия 3,2%, литиевая соль гепарина, натриевая соль

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.

гепарина K_2 ЭДТА, K_3 ЭДТА), подтверждена не менее чем на 25 положительных и 25 отрицательных образцах каждого вида биоматериала в анализе с помощью набора «ГепатитИФА-НВsAg сенс подтверждающий».

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

6.4. Разведение исследуемых образцов сыворотки и плазмы крови. Если по предварительным данным или по результатам анализа при использовании набора «ГепатитИФА-НВsAg сенс» ОП исследуемых образцов выше ОП ПКП, образцы следует развести буфером Д сенс (см. п. 7.1.14). При первичной постановке следует проводить анализ цельного образца и его разведений. Хранение разведенных образцов не допускается. При повторном исследовании тех же образцов сыворотки или плазмы крови необходимо приготовить новое разведение.

6.5. 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. Контрольный буфер готов к использованию.

7.1.4. Нейтрализующий буфер готов к использованию.

7.1.5. Конъюгат Е1 готов к использованию.

7.1.6. Буфер Е2 готов к использованию.

7.1.7. Конъюгат Е2. Непосредственно перед анализом необходимое количество Конъюгата 2 (10Х) развести Буфером Е2 в 10 раз.

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

7.1.8. Буфер Д сенс готов к использованию.

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

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

7.1.10. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию.

7.1.11. Стоп-реагент готов к использованию.

7.1.12. 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.

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

7.1.14. Разведение исследуемых образцов.

Если по результатам анализа цельных образцов необходимо их разведение, то развести образцы Буфером Д сенс в 100 и в 1000 раз. Пример разведения образца вручную приведен ниже:

Образец № 1 (разведение в 100 раз):

990 мкл Буфера Д сенс + 10 мкл исследуемого образца.

Образец № 2 (разведение в 1000 раз):

270 мкл Буфера Д сенс + 30 мкл образца №1.

Если по результатам анализа для разведенных образцов в 100 и 1000 раз необходимо дополнительное разведение, то развести образцы Буфером Д сенс в 5000 и в 10000 раз. Пример разведения образца вручную приведен ниже:

Образец № 3 (разведение в 5000 раз):

240 мкл Буфера Д сенс + 60 мкл образца №2.

Образец № 4 (разведение в 10000 раз):

270 мкл Буфера Д сенс + 30 мкл образца №2.

В случае необходимости аналогично приготовить дальнейшие разведения.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

Разводить образцы следует только в день проведения анализа.

При проведении анализа на анализаторе «Alisei» разведение исследуемых образцов также следует производить вручную.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Ручная постановка

На странице 34 приведена схема ручной постановки анализа.

7.2.1.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом (в нечетные стрипы следует вносить контрольный буфер, в четные – нейтрализующий):

A1, A2–№ 1 - для измерения величины ОП раствора ТМБ⁸;

B1–№ 2 - для измерения величины ОП ОКП с контрольным буфером;

B2–№ 3 - для измерения величины ОП ОКП с нейтрализующим буфером;

C1–№ 4 - для измерения величины ОП СКП с контрольным буфером;

C2–№ 5 - для измерения величины ОП СКП с нейтрализующим буфером;

D1–№ 6 - для измерения величины ОП ПКП с контрольным буфером;

D2–№ 7 - для измерения величины ОП ПКП с

⁸ При настройке спектрофотометра «по воздуху» допускается не проводить измерение ОП раствора ТМБ

нейтрализующим буфером;

Е1–№ 8 - для измерения величины ОП образца №1 с контрольным буфером;

Е2–№ 9 - для измерения величины ОП образца №1 с нейтрализующим буфером и т.д.

Примечание: остальные образцы вносить по аналогии с образцом №1.

7.2.1.2. Во все лунки, кроме лунок А1 и А2, внести по 25 мкл конъюгата Е1.

7.2.1.3. Во все нечетные стрипы, кроме лунки №1, внести по 25 мкл контрольного буфера.

7.2.1.4. Во все четные стрипы, кроме лунки №1, внести по 25 мкл нейтрализующего буфера.

7.2.1.5. Внести в соответствующие лунки по 100 мкл контрольных проб и исследуемых образцов.

Примечание: В наборе «ГепатитИФА-НВsAg сенс подтверждающий» 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.

7.2.1.6. Инкубировать стрипы. Возможны 2 варианта инкубации:

- Инкубировать стрипы в течение 60 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

- Инкубировать стрипы в течение 40 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +42°C со скоростью 500–800 об/мин.

7.2.1.7. По окончании первой инкубации без промывки и не удаляя содержимого лунок, во все лунки, кроме лунок

А1 и А2, немедленно внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата Е2, приготовленного по п.7.1.7.

7.2.1.8. Инкубировать стрипы. Возможны 2 варианта инкубации:

- Инкубировать стрипы в течение 20 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ или $+42^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500–800 об/мин.

***Примечание:** Инкубацию №2 следует проводить в условиях аналогичных инкубации №1 (при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ или $+42^{\circ}\text{C}$)*

7.2.1.9. 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 добавить по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п.7.1.9., 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.

7.2.1.10. 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 при встряхивании в термостатируемом шейкере при

температуре +37°C или +42°C со скоростью 500-800 об/мин.

- **Инкубирование стрипов в темноте в течение 30 минут без шейкирования при комнатной температуре (+18...25°C).**

7.2.1.11. 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.

7.2.1.12. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п.7.2.1.11., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре.

7.2.2. Постановка на анализаторе «Alisei»

Анализатор «Alisei» имеет полностью автоматизированный процесс проведения анализа: внесение реагентов, промывка, инкубирование, измерение оптической плотности, обработка результатов. Программа подтверждения наличия HBsAg введена в память анализатора.

7.2.2.1. При каждой постановке анализа обязательно нужно определять ОП, полученные для ОКП, СКП и ПКП в лунках с контрольным и нейтрализующим буферами.

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. Если значение оптической плотности в лунках с контрольным буфером, содержащих ПКП, превышает предел линейного измерения спектрофотометра, считывание результатов проводят при 405 нм. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора.

При регистрации результатов необходимо вычитать ОП, полученную на референсном фильтре, из ОП, полученной при 450 нм (или при 405 нм), для каждой лунки.

Необходимо вычитать ОП, полученную в лунке с ТМБ, из значений ОП всех остальных лунок.

Примечание: значение ОП в лунке с ТМБ не должно превышать 0,09 ед. ОП при 450 нм. Допускается настройка спектрофотометра «по воздуху».

8.2. Критерии достоверности анализа

Результаты анализа считают достоверными при соблюдении следующих условий:

- значение ОП в лунках с контрольным и нейтрализующим буферами, содержащей ОКП, должно быть не более 0,2 ед. ОП (при 450 нм);

- значение ОП в лунке с контрольным буфером, содержащей СКП, должно быть не менее 0,4 ед. ОП (при 450 нм);
- значение ОП в лунке с контрольным буфером, содержащей ПКП, должно быть не менее 2,0 ед. ОП (при 450 нм);
- коэффициент нейтрализации для СКП должен быть не менее 50% (см. п.9);
- коэффициент нейтрализации для ПКП должен быть не менее 50% (см. п.9).

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ (только для ручной постановки)

Определить значение ОПкрит., для чего к среднему значению ОП ОКП в лунках с контрольным и нейтрализующим буферами прибавить Ккрит.

Ккрит. – это коэффициент, определяемый на предприятии-изготовителе и указанный в паспорте.

$$\text{ОПкрит.} = \text{ОПср.окп} + \text{Ккрит.}$$

Если ОП анализируемого образца в лунке с контрольным буфером меньше значения ОПкрит, то коэффициент нейтрализации для него не рассчитывать.

Для образцов, чьи ОП в лунках с контрольным буфером больше или равны значению ОПкрит, рассчитать коэффициент нейтрализации (КН) по формуле:

$$\text{КН} = \left(\frac{\text{ОПкб} - \text{ОПнб}}{\text{ОПкб} - \text{ОПср.окп}} \right) * 100\%,$$

где ОПкб – оптическая плотность образца в лунке с контрольным буфером, ед.опт.пл.;

ОПнб – оптическая плотность образца в лунке с нейтрализующим буфером, ед.опт.пл.;

ОПср.окп – средняя оптическая плотность ОКП в лунках с контрольным и нейтрализующим буферами, ед.опт.пл.

Полученный результат необходимо округлить до целого значения.

10. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таблица 2

ОП цельного образца в лунке с контрольным буфером	Коэффициент нейтрализации образца	Интерпретация результатов
$\geq$ ОПкрит., но $< 0,5$ ед.опт.пл.	$< 50\%$	НВsАg отсутствует
$\geq$ ОПкрит.	$\geq 50\%$	Наличие НВsАg подтверждено
$> 0,5$ ед.опт.пл.	$< 50\%$	Развести образец буфером Д сенс в 100 и 1000 раз согласно п.7.1.14 и повторить анализ
$<$ ОПкрит.	расчет не требуется	НВsАg отсутствует

Таблица 3

ОП разведенного образца в лунке с контрольным буфером*	Коэффициент нейтрализации образца	Интерпретация результатов
$\geq$ ОПкрит., но $< 0,5$ ед.опт.пл.	$< 50\%$	НВsАg отсутствует
$> 0,5$ ед.опт.пл.	$< 50\%$	Дополнительно развести образец буфером Д сенс согласно п.7.1.14 и повторить анализ
$\geq$ ОПкрит.	$\geq 50\%$	Наличие НВsАg подтверждено
$<$ ОПкрит.	расчет не требуется	НВsАg отсутствует

* Если подтверждено наличие/отсутствие НВsАg в меньшем разведении образца, то другие разведения не оцениваются.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1. Набор «ГепатитИФА-НВsАg сенс подтверждающий» должен храниться в упаковке

латитИФА-НВsAg сенс подтверждающий В-
предприятия-изготовителя при температуре +2...8°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°C в течение всего срока годности;

- контрольные пробы, буфер Д сенс, контрольный и нейтрализующий буферы, конъюгат Е1, концентрированный конъюгат Е2, раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°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°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 серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

- для каждого независимого анализа необходимо определение ОП ОКП, СКП, ПКП в лунках с контрольным и нейтрализующим буферами;
- запрещается возвращать избыток контрольного и нейтрализующего буферов, 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	Контрольный буфер, мл	Нейтрализующий буфер, мл	Конъюгат Е2 (1X рабочий раствор), мл		Промывочный раствор		Раствор ТМБ, мл	Стоп-реагент, мл
				Конъюгат Е2 (10X), мл	Буфер Е2, мл	Буфер Н (20X), мл	Дистиллированная или очищенная деионизованная вода, мл		
2	1,0	0,4	0,4	0,13	1,17	8	до 160	2,3	2,3
4	2,0	0,8	0,8	0,27	2,43	16	до 320	4,7	4,7
6	3,0	1,2	1,2	0,40	3,60	24	до 480	7,0	7,0
8	4,0	1,6	1,6	0,53	4,77	32	до 640	9,3	9,3
10	5,0	2,0	2,0	0,67	6,03	40	до 800	11,7	11,7
12	6,0	2,5	2,5	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°C.

Транспортирование изделий при температурах +2...8°C должно производиться в ёмкостях или при помощи холодильных установок, обеспечивающих регламентированный температурный режим.

Допускается транспортирование набора при температуре до +25°C не более 15 суток, в том числе при температуре +37°C не более 1 суток.

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

13. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

13.1. При утилизации отходов необходимо руководствоваться СанПиН 2.1.3684-21 и 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 2.1.3684-21.

14. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам качества набора «ГепатитИФА-НВsAg сенс подтверждающий» 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 21.20.23-527-98539446-2019.

Примечания к Схемам проведения анализа (стр. 34):

КП – контрольные пробы;

ОП – оптическая плотность;

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

ПО - программное обеспечение.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА (только для ручной постановки)

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания	
1	Внесение	25 мкл Конъюгата Е1	КТ (+18...+25°C)	Внесение КП и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить	
2	реагентов	25 мкл контрольного буфера в нечетные стрипы				
3		25 мкл нейтрализующего буфера в четные стрипы				
4		100 мкл КП				
5		100 мкл исследуемых образцов				
6	Инкубация №1	—	+37°C	60'	по выбору	Термостатируемый шейкер, 500 – 800 об/мин
			+42°C	40'		
7	Внесение конъюгата	50 мкл Конъюгата Е2 (1X)			В лунку для определения ОП ТМБ Конъюгат Е2 не вносить	
8	Инкубация №2	—	+37°C	20'	от условий инкубации и №1	Термостатируемый шейкер, 500 – 800 об/мин
			+42°C			
9	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (8 раз)			1*промывочный раствор = 50 мл буфера Н (20X) + 950 мл Н ₂ O	
10	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			Во все лунки	
11	Инкубация с ТМБ	—	+37°C	15'	от условий инкубаций №№ 1, 2	Термостатируемый шейкер 500-800 об/мин
			+42°C			
			КТ	30'		При любых условиях инкубации В темноте, без шейкирования
12	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента				
13	Перемешивание	—	КТ	20-30"	по выбору	Постукивание рамки
			КТ	5-10"		Шейкер
14	Регистрация результатов			В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм или 405 нм (600-655 нм)	
15	Обработка результатов				Калькулятор, соответствующее ПО	

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 34 (тридцать четыре) лист 9

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Д.Г. Полынцев

