

СОГЛАСОВАНО

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «ПИМУ»
Минздрава России
д.м.н. А. С. Благоданова

«10» декабря 2021 г.



**ИНСТРУКЦИЯ
по применению**

**Набор реагентов
«ДС-ИФА-НВsAg»**

**Тест-система иммуноферментная для выявления
или подтверждения поверхностного антигена
вируса гепатита В**



REF



96

REF



192

REF



480

REF



48 (для подтверждения)



УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального директора
ООО «НПО «Диагностические системы»

О.Н. Шлюндин

«10» декабря 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ по применению

Набор реагентов «ДС-ИФА-НВsAg»

**Тест-система иммуноферментная для выявления
или подтверждения поверхностного антигена
вируса гепатита В**

Содержание

I.	НАЗНАЧЕНИЕ	
II.	ПРИНЦИП ТЕСТА	
III.	СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	
IV.	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	
V.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	
VI.	УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ	
VII.	НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ.....	
VIII.	ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ	
IX.	ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ	
X.	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	
XI.	УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	
XII.	ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА	
XIII.	СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ	
XIV.	ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ И РЕМОНТ.....	
XV.	ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА	
XVI.	ОБЪЯСНЕНИЕ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СИМВОЛОВ	I.
	Приложение 1.....	
	Приложение 2.....	

Набор реагентов выпускается в четырех комплектах:

Комплекты 1, 2, 3¹ – 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 подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В, рассчитан на проведение 48 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен как для ручной постановки, так и для постановки на ИФА-анализаторах открытого типа, с возможностью дробного использования.

¹Комплекты 1,2,3 набора реагентов эквивалентны по назначению, свойствам и функциональным характеристикам.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов «ДС-ИФА-НВsAg» Тест-система иммуноферментная для выявления или подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В» предназначен для выявления или подтверждения НВsAg в образцах сыворотки (плазмы) крови человека, препаратах, приготовленных из крови человека (альбумине). Возможно выявление или подтверждение, как диких типов, так и мутантных вариантов поверхностного антигена вируса гепатита В.

Рекомендуется для клинической лабораторной диагностики гепатита В и скрининга потенциально инфекционных образцов с целью предотвращения их дальнейшего использования в качестве донорского материала.

Предназначен для профессионального использования специально обученным персоналом.

Вирусный гепатит В – повсеместно распространенное инфекционное заболевание, вызываемое одноименным вирусом (HBV). НВsAg – основной серологический маркер HBV-инфекции. Область применения тест-системы «ДС-ИФА-НВsAg» – клиническая лабораторная диагностика HBV-инфекции, скрининг донорской крови.

II. ПРИНЦИП ТЕСТА

Принцип действия набора реагентов «ДС-ИФА-НВsAg» основан на твердофазном ИФА (одностадийный «сэндвич»-вариант). НВsAg в исследуемом образце одновременно связывается с антителами к НВsAg, сорбированными в лунках планшета, и с антителами к НВsAg, мечеными пероксидазой хрена, в конъюгате. Не связавшиеся реагенты удаляются в ходе промывки. Далее добавляется субстратная смесь на основе ТМБ. Реакция останавливается добавлением серной кислоты. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации НВsAg в исследуемом образце.

Подтверждение наличия НВsAg в образце основано на реакции нейтрализации. К исследуемому образцу добавляется нейтрализующий реагент, содержащий поликлональные антитела к НВsAg, которые связывают НВsAg и делают невозможным образование комплекса НВsAg с антителами в составе иммуносорбента и конъюгата.

Учет результатов можно проводить при длине волны 450 нм или 450/620-680 нм.

III. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

3.1. Состав набора:

Таблица 1

Характеристики реагентов		Форма выпуска			
		Комплект 1 $\nabla_{\Sigma} 96$	Комплект 2 $\nabla_{\Sigma} 192$	Комплект 3 $\nabla_{\Sigma} 480$	Комплект 4 $\nabla_{\Sigma} 48$
Иммуносорбент	Планшет полистироловый 96-луночный разборный до стрипов (или до лунок), в лунках которого сорбированы антитела к НВsAg (анти-НВs). Готов к применению.	1 планшет	2 планшета	5 планшето	1 планшет
Конъюгат	Концентрат ($\times 11$). Анти-НВs, меченные пероксидазой хрена. Прозрачная или опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 1,2 мл	1 флакон 1,2 мл	1 флакон 3,6 мл или 3 флакона по 1,2 мл	1 флакон 1,2 мл
РРК	Раствор для разведения Конъюгата. Готов к применению. Опалесцирующая голубого цвета жидкость, допустимо образование осадка, растворяющегося при встряхивании. Содержит 0,2% ProClin 300*.	1 флакон 12,0 мл	1 флакон 12,0 мл	3 флакона по 12,0 мл или 2 флакона по 18,0 мл	1 флакон 12,0 мл
К+1	Контрольный положительный образец, инактивированный, содержащий НВsAg. Готов к применению. 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 слабopоложительный образец, инактивированный, содержащий НВsAg с концентрацией $0,150 \pm 0,05$ МЕ/мл. Готов к применению. Прозрачная или опалесцирующая оранжевого цвета жидкость.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	-
К-	Контрольный отрицательный образец, инактивированный. Готов к применению. Прозрачная или опалесцирующая зелёного цвета жидкость.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	2 флакона по 2,5 мл или 1 флакон 5,0 мл	1 флакон 2,5 мл
ПР	Промывочный раствор. Концентрат ($\times 25$) 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 °C и встряхивании.	1 флакон 50,0 мл или 1 флакон 120,0 мл	2 флакона по 50,0 мл или 1 флакон 120,0 мл	4 флакона по 50,0 мл или 2 флакона по 120,0 мл	1 флакон 50,0 мл или 1 флакон 120,0 мл

Стоп-реагент	Раствор серной кислоты (0,2М)*. Готов к применению. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	2 флакона по 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	4 флакона по 25,0 мл или 2 флакона по 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл
СБ	Субстратный буферный раствор – цитратный буфер, содержащий раствор перекиси водорода. Готов к применению. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	3 флакона по 25,0 мл или 2 флакона по 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл
ТМБ	Концентрат (×11). Раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Прозрачная бесцветная жидкость, возможно наличие окраски.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	3 флакона по 2,5 мл или 2 флакона по 3,5 мл	1 флакон 2,5 мл
АНТИ-НВs-ПЛЮС	Нейтрализующий реагент, инактивированный. Готов к применению. Прозрачная или слегка опалесцирующая розового цвета жидкость.	-	-	-	1 флакон 2,0 мл
АНТИ-НВs-МИНУС	Контрольный реагент, инактивированный. Готов к применению. Прозрачная или слегка опалесцирующая голубого цвета жидкость.	-	-	-	1 флакон 2,0 мл
Плётка защитная для ИФА-планшетов		1 шт.	2 шт.	5 шт.	1 шт.
Наконечники одноразовые		16 шт.	32 шт.	80 шт.	16 шт.
Ванночка пластиковая для жидких реагентов		2 шт.	4 шт.	10 шт.	2 шт.
Пакет полиэтиленовый с замком Zip-Lock		1 шт.	2 шт.	3 шт.	1 шт.
Инструкция по применению		1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.

* Указано содержание вредных веществ в опасных концентрациях для реагентов, обозначенных символом «Внимание».

Набор комплектуется готовыми реагентами и концентрированными растворами. Имеется маркировка посредством штрих-кодов, а также цветовая кодировка для ряда реагентов. Цветовая кодировка реагентов – условное обозначение цвета/окраски жидких реагентов. К+1 – красный; К+2 – оранжевый; К- – зелёный.

Набор упакован в потребительскую упаковку (коробку картонную). Паспорт на серию входит в комплект сопроводительной документации на продукцию.

IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. Аналитическая чувствительность оценивалась с использованием международных стандартов:

- Second International Standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A (NIBSC code: 00/588).
- Third International Standard for HBsAg HBV genotype B4, HBsAg subtypes ayw1/adw2 (NIBSC code: 12/226).

Уровень чувствительности тест-системы при детекции поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) составляет: 0,1 МЕ/мл (термостат); 0,05 МЕ/мл (термошейкер); 0,01 МЕ/мл (термостат (37,0 ± 1,0) °С, 18 часов).

Чувствительность набора реагентов при выявлении поверхностного антигена вируса гепатита В:

- в альбумине – 1,0 МЕ/мл (термостат); 0,5 МЕ/мл (термошейкер).

4.2. Аналитическая специфичность

Определено, что наличие в тестируемых образцах гемоглобина в концентрации до 1,25 мг/мл, билирубина в концентрации до 0,4 мг/мл, триглицеридов в концентрации до 0,4 мг/мл не влияет на качество работы набора реагентов «ДС-ИФА-НВsAg».

4.3. Диагностическая чувствительность оценивалась при исследовании:

- 453 образцов сыворотки (плазмы) крови пациентов с острым и хроническим гепатитом В и составила 100% (95%CI: 99,2-100%).
- 11 коммерческих сероконверсионных панелей (ВВІ и ZeptoMetrix, США). Из 176 образцов сероконверсионных панелей «ДС-ИФА-НВsAg» выявил как позитивные 53 образца. Набор реагентов «ДС-ИФА-НВsAg» выявил HBV инфекцию в среднем через 70,45 дней после первой кроводачи (для данного набора панелей).
- Панели HBsAg native mutants in CDP Plasma (Trina Code: DH1200, Trina Bioreactives AG). Из 48 образцов панели выявлено 47.

4.4. Специфичность оценивалась при исследовании:

- 5010 образцов сыворотки (плазмы) крови доноров случайной выборки. Специфичность составила 99,9% (95%CI: 99,82-99,98%).
- 770 образцов сыворотки (плазмы) крови человека от клинических пациентов с гепатитом С. Специфичность составила 99,6% (95%CI: 98,86-99,87%).
- 246 образцов сыворотки (плазмы) крови беременных женщин. Специфичность составила 99,6% (95%CI: 97,73-99,93%).
- 194 образцов сыворотки (плазмы) крови от клинических пациентов с различными неинфекционными заболеваниями. Специфичность составила 99,5% (95%CI: 97,14-99,91%).
- 50 образцов препаратов крови человека:
– 35 образцов альбумина. Специфичность составила 100% (95%CI: 90,11-100%).

Если процедура получения и подготовки образцов для исследования не соответствует требованиям, изложенным в п.VIII настоящей инструкции, показатели специфичности могут отличаться от указанных.

4.5. Воспроизводимость

Воспроизводимость оценена с использованием 3 положительных образцов внутри планшета и между планшетами на трёх сериях набора реагентов. Коэффициенты вариации не превысили 10%.

Для оценки вариабельности теста было протестировано 3 образца сыворотки крови человека: высоким, средним и низким содержанием HBsAg.

Для оценки внутрипланшетной воспроизводимости эти образцы были протестированы 25 раз в одной постановке «ДС-ИФА-НВsAg». Коэффициент вариации не превышал 7%.

Для оценки межпланшетной воспроизводимости эти образцы были протестированы в дубликатах в течение 3 дней двумя разными операторами. Коэффициент вариации не превышал 10%.

Для анализа рисков получения ложноотрицательных результатов при повторном тестировании слабopоложительных образцов проведено многократное исследование 3 образцов с ОП близкой ОКрит. С вероятностью 85,8% можно ожидать, что образцы с ОП $\pm 20\%$ от ОКрит. будут давать постоянный результат при тестировании в «ДС-ИФА-НВsAg».

4.6. Эквивалентность образцов сыворотки и плазмы крови человека

Дополнительными исследованиями коллекции положительных (n=25) и отрицательных (n=25) парных образцов сыворотки и плазмы была показана их эквивалентность, что позволяет отнести показатели диагностической чувствительности и специфичности к обоим видам исследуемых образцов.

V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Нестерильное медицинское изделие для диагностики *in vitro*. 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 лаборатории диагностики специально обученным персоналом. При работе с набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования к безопасности».

5.3. Реагенты набора не горючие. Внешняя упаковка не является самовоспламеняющейся взрывоопасной.

5.4. Реагенты набора не содержат вредных веществ в опасных концентрациях, за исключением реагентов, обозначенных символом «Внимание». При использовании по назначению вероятность негативного воздействия на организм человека незначительна. Растворы в представленных объемах и концентрациях не опасны 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.

5.5. Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инаktivированы.

5.6. Материал человеческого происхождения, использованный для приготовления контрольных образцов К+1 и К+2, не содержит антиген р24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1,2, HCV, содержит HBsAg.

5.7. Материал человеческого происхождения, использованный для приготовления контрольного образца К-, АНТИ-HBs-ПЛЮС и АНТИ-HBs-МИНУС, не содержит HBsAg, антиген р24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1,2 и HCV.

5.8. При работе с реагентами набора (К+1, К+2, К-, АНТИ-HBs-ПЛЮС и АНТИ-HBs-МИНУС) и исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.9. Отдельные реагенты набора приготовлены с использованием биологического материала животного происхождения.

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

5.11. Для получения надежных результатов необходимо:

- обеспечить установленные условия хранения набора;
- строго соблюдать требования Инструкции по применению набора реагентов.

5.12. Не использовать МИ:

- при повреждении целостности упаковки реагентов;
- при несоответствии внешнего вида реагентов (см. п. III Состав набора реагентов);
- при повреждении маркировки.

VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

6.1. Изделия в процессе хранения и транспортирования не выделяют вредных веществ, загрязняющих окружающую среду. Отходы, образующиеся в результате применения набора реагентов (включая принадлежности) по назначению, установленному производителем, а также неиспользованные изделия (истекший срок годности, поврежденная потребительская упаковка/маркировка, поврежденная упаковка/маркировка реагентов и т.д.) относятся к медицинским отходам класса «А», «Б» и «Г» в соответствии со ст. 49 Федерального закона от 21.11.2011 г. N 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

6.2. Медицинские отходы подлежат сбору, обезвреживанию, размещению, хранению, транспортировке, учету и утилизации в соответствии с действующими правилами и нормативами (СанПиН 2.1.3684-21, СанПиН 3.3686-21, МУ 287-113).

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

- Вода дистиллированная (деионизированная);
- Дозаторы пипеточные переменного объема для отбора жидкостей;
- Наконечники одноразовые для дозаторов пипеточных;
- Инкубатор микропланшетный (термостат) $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$;
- Термостатируемый шейкер (термошейкер) $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ или $(42,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$;
- Устройство для промывания планшетов (вошер);
- Планшетный спектрофотометр (ИФА-ридер) с фильтрами 450 нм и 620-680 нм;
- Для постановки ИФА в автоматическом режиме – любая модель ИФА-анализаторов открытого типа;
- Бумага фильтровальная лабораторная;
- Средства измерения времени (часы, таймер).

VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови проводить в соответствии с текущей практикой методом венепункции.

Для анализа использовать только нативные (неразведенные) образцы сыворотки крови человека или плазмы крови человека с различными антикоагулянтами (ЭДТА, гепарин, цитрат натрия). Во избежание гемолиза нужно как можно быстрее отделить плазму от эритроцитов или сыворотку от сгустка. Образцы, содержащие агрегаты или осадок, осветлять центрифугированием.

Не использовать для анализа следующие образцы: термоинактивированные, консервированные азидом натрия, с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией.

Жидкие препараты крови исследовать неразведёнными; 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 18 °С (замораживание/оттаивание не более 3 раз). Во избежание осаждения фибрина плазму размораживать в течение нескольких минут при температуре $(39,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на водяной бане.

IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

9.1. Общие требования и рекомендации:

- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:
 - Неспецифических реагентов (ПР, СБ), которые взаимозаменяемы во всех наборах реагентов производства ООО «НПО «Диагностические системы»;
 - **Стоп-реагента**, который может быть взаимозаменяемым в зависимости от молярности раствора;
 - другие реагенты также могут быть взаимозаменяемыми для постановки в большинстве наборов реагентов производства ООО «НПО «Диагностические системы»;
 - за более детальной информацией относительно других реагентов обратитесь в службу поддержки пользователей по телефону бесплатной линии 8-800-555-0300 (доб. 7647, 7655) или по E-mail: info@npods.ru, help-ds@npods.ru.
- Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение. Использовать одноразовую или чистую тщательно вымытую лабораторную посуду для приготовления реагентов. Не допускать контакта металлических предметов с Конъюгатом, Субстратной смесью.
- Каждая лунка Иммуносорбента предназначена для однократного использования.
- Не подвергать реагенты и рабочие растворы воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.
- Перед использованием флаконы с жидкими реагентами перемешать, не допуская вспенивания.

9.2. Реагенты, готовые к использованию:

- **Иммуносорбент.** Планшет, состоящий из 12 стрипов и рамки, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1 см от края пакета, и взять необходимое количество стрипов.
- **K+1, K+2, K-, Стоп-реагент (0,2М), АНТИ-НВs-ПЛЮС, АНТИ-НВs-МИНУС.**

9.3. Реагенты, требующие предварительного приготовления:

- **Рабочий ПР.** Необходимый объём концентрата ПР ($\times 25$) развести в 25 раз соответствующим объёмом воды, дистиллированной (деионизированной) (см. таблицу 2) и тщательно перемешать.

- **Рабочий Конъюгат.** Необходимый объём концентрата Конъюгата ($\times 11$) развести в 11 раз соответствующим объёмом РРК (см. таблицу 2), осторожно перемешать, не допуская вспенивания.

Возможно приготовление рабочего раствора непосредственно во флаконе с РРК. Для этого нужно все содержимое флакона с концентратом Конъюгата (форма выпуска 1,2 мл) перенести во флакон с РРК (форма выпуска 12,0 мл) и тщательно перемешать, не допуская вспенивания.

Внимание! При постановке с инкубацией в течение 18 часов (процедура 1 – (термостат $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$) объём концентрата Конъюгата ($\times 11$) для приготовления рабочего раствора Конъюгата может быть изменен. Кратность концентрата Конъюгата указана на дополнительной этикетке, на внутренней стороне фасовочной коробки.

- **Субстратная смесь (СС).** Необходимый объём концентрата ТМБ ($\times 11$) развести в 11 раз соответствующим объёмом СБ (см. таблицу 2) и тщательно перемешать.

Возможно приготовление СС непосредственно во флаконе с СБ. Для этого нужно отобрать дозатором пипеточным необходимый объём ТМБ (2,5 мл или 5,0 мл), перенести в соответствующий флакон с СБ (25,0 мл или 50,0 мл) и тщательно перемешать.

Таблица 2

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

Количество используемых стрипов		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Рабочий РР	ПР ($\times 25$), 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
	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
Рабочий Конъюгат	Конъюгат ($\times 11$), 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
	РРК, 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
СС	ТМБ ($\times 11$), 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
	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

Х. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

10.1. Общие требования и рекомендации:

- Использовать валидированные дозаторы и оборудование.
- Использовать новые наконечники для каждого образца.
- Перед использованием набор реагентов выдержать не менее 30 мин при комнатной температуре.
- Перед использованием ванночки пластиковые для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной (деионизированной).
- Не использовать одну и ту же ванночку пластиковую для внесения Конъюгата и Субстратной смеси.
- Избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы.
- Не допускать высыхания лунок Иммуносorbента между отдельными операциями.
- Соблюдать требования к промывке (рекомендованное количество циклов, объём раствора при наполнении, временные интервалы, эффективность отсасывания).
- Многократные флаконы (ванночки) для ИФА-анализаторов сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной (деионизированной). Затем промыть 70% раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной (деионизированной).
- Плёнки защитные для ИФА планшетов являются одноразовыми и повторному использованию после снятия не подлежат.

10.2. Проведение ИФА при ручной постановке:

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

Процедура Этап	Процедура 1 (термостат (37,0 ± 1,0) °C)	Процедура 2 (термошейкер (42,0 ± 1,0) °C, 500 об/мин)	Процедура 3 (термошейкер (37,0 ± 1,0) °C, 500 об/мин)
Для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В			
1	Внести в лунки Иммуносорбента 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.		
Для подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В			
1.1	В зависимости от числа подлежащих подтверждению образцов определить необходимое количество стрипов Иммуносорбента. Для подтверждения одного образца необходимы 2 лунки. Для внесения контрольных образцов необходимо зарезервировать 8 лунок.		
1.2	Внести в лунки Иммуносорбента по 100 мкл контрольных образцов: в 5 лунок – К-, в 3 лунки – К+1. В остальные лунки Иммуносорбента внести исследуемые образцы каждый в 2 лунки по 100 мкл.		
1.3	В одну лунку с К-, К+1 и каждым исследуемым образцом внести по 25 мкл реагента АНТИ-НВs-МИНУС. В другую лунку с К-, К+1 и каждым исследуемым образцом внести по 25 мкл реагента АНТИ-НВs-ПЛИУС.		
2	Во все лунки внести по 50 мкл раствора рабочего Конъюгата. При добавлении Конъюгата не допускать заноса образца из одной лунки в другую через наконечники.		
3	Планшет накрыть защитной плёнкой, плотно прижав по всей поверхности планшета, и инкубировать:	Планшет без защитной плёнки инкубировать:	
	2 часа или 18 часов	1 час	1 час 30 мин
4	С помощью устройства для промывания планшетов удалить содержимое лунок и промыть планшет 4 раза рабочим раствором ПР. Для этого осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета до краёв (рекомендуется использовать автоматический микропланшетный вошер в режиме перекрёстной аспирации и пропускать через лунку не менее 500 мкл рабочего ПР), выдержать 40 сек, затем удалить в ёмкость с дезинфицирующим раствором. Удалить остатки влаги путем отстукивания по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге*.		
5	Во все лунки внести по 100 мкл СС.		
6	Планшет выдержать 20 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 25 °C или 15 мин при температуре (37,0 ± 1,0) °C.		
7	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.		

Схемы проведения ИФА приведены в Приложениях 1 и 2.

* Для исключения неспецифического окрашивания раствора в лунках планшета с целью удаления остатков Конъюгата с поверхности Иммуносорбента, после промывки ПР допускается ополаскивание Иммуносорбента дистиллированной водой (заливая весь планшет и вытряхивая над ёмкостью) с последующим удалением остатков влаги путём отстукивания по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге. Данную операцию проводить с использованием средств индивидуальной защиты (резиновых перчаток, защитных очков или экрана).

10.3. Проведение ИФА в автоматическом режиме:

Для постановки набора в автоматическом режиме рекомендуется использовать валидированный протокол, предоставленный производителем. При самостоятельном создании протокола, он должен соответствовать п. X «Проведение анализа», и должны выполняться все требования, описанные в п. V «Меры предосторожности».

При приготовлении рабочих растворов реагентов для автоматической постановки необходимо учитывать «мёртвый» объём флаконов или ёмкостей, используемых для загрузки рабочих растворов в ИФА-анализатор.

При постановке набора на ИФА-анализаторе для Комплектов 1 и 3 предполагается дробное использование планшета не более чем в 7 постановках, для Комплекта 2 предполагается дробное использование не более чем в 3 постановках, для Комплекта 4 предполагается дробное использование не более чем в 4 постановках.

Валидированные протоколы постановки набора и таблицы разведения рабочих растворов реагентов для разных моделей ИФА-анализаторов можно получить от производителя по запросу (см. п. XV).

Производительность ИФА-анализаторов EVOLIS (BIO-RAD) и Gemini (Stratec) составляет 43 теста/ч при тестировании одного планшета «ДС-ИФА-НВsAg» и 68 тест/ч при тестировании двух планшетов. Среднее время до получения первого результата составляет 2 ч 2 мин.

10.4. Спектрофотометрический контроль внесения образцов и реагентов при постановке на ИФА-анализаторах:

- Контроль внесения образцов рекомендуется проводить при длине волны 450 нм, критерий: ОП > 0,125.
- Контроль внесения рабочего раствора Конъюгата рекомендуется проводить при длине волны 620 нм, критерий: ОП > 0,400.
- Контроль внесения СС рекомендуется проводить при длине волны 450 нм, критерий: ОП > 0,040.

XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ**11.1. Для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В:**

Результаты ИФА учитывать, если значение ОП в лунках с К+1 – не менее 0,600, а среднее значение ОП в лунках с К- – не более 0,120. Если одно из значений ОП К- выходит за этот предел, его следует исключить из расчёта среднего значения. Если исключению подлежат более одного значения ОП К-, анализ следует повторить.

ОП К+2 должна быть $\geq$ ОПкрит.

ОПкрит. рассчитывают по формуле:

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

где **A** – 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 набора реагентов.¹

¹ «Для серии № 076XXX величина коэффициента $A = X,XXX$ »

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

Исследуемые образцы расцениваются как положительные: если ОП образца $\geq$ ОПкрит.

Первичноположительные образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках для подтверждения первоначального результата. Если при повторном исследовании величина ОП образца в обеих лунках меньше ОПкрит., то образец расценивается как отрицательный. 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.

11.2. Для подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В:

Расчет ОПкрит., оценку валидности результатов ИФА по ОП К-, ОП К+1, проводить как описано в п.11.1.

Значения ОП в лунках с К- после внесения АНТИ-HBs-МИНУС и АНТИ-HBs-ПЛЮС должны быть ниже ОПкрит.

Присутствие поверхностного антигена вируса 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:

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

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% и более.

Образец считается содержащим HBsAg, если соблюдаются 2 условия:

- ОПк ≥ ОПкрит.;
- показатель нейтрализации 50% и более.

В ряде случаев в образцах с ОП ≥ 1,0 показатель нейтрализации может быть менее 50% из-за высокого содержания HBsAg. В этом случае образец следует развести рабочим промывочным раствором и повторить тестирование (рекомендуется развести в 25, 250 раз и более при необходимости). Образец считается содержащим HBsAg, если хотя бы для одного из выбранных разведений соблюдаются 2 условия:

- ОПк ≥ ОПкрит.;
- показатель нейтрализации 50% и более.

XII. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

- 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.
- Отрицательные результаты могут быть получены, если количество поверхностного антигена вируса гепатита В в образце ниже уровня чувствительности теста, или если он отсутствует на той стадии заболевания, когда был отобран образец.
- Клинический диагноз не может основываться на результате одного теста, а должен базироваться на корреляции результатов лабораторных исследований с клиническими данными.
- Данная тест-система была разработана и исследована на индивидуальных сыворотках (плазмах) больных/доноров. Нельзя использовать объединённые образцы, поскольку точность таких результатов не исследовалась.

XIII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

13.1.	Срок годности набора реагентов 24 месяцев. Наборы с истекшим сроком годности использованию не подлежат.
13.2.	Условия хранения набора реагентов. Хранить наборы при температуре от 2 до 8 °С в сухом, защищенном от света месте с использованием оборудования и помещений, обеспечивающих заданные условия, в соответствии с установленными правилами. Замораживание не допускается. Наборы, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, использованию не подлежат.

13.3.	Условия транспортирования набора реагентов.		
	Транспортировать наборы следует крытым транспортом, с соблюдением температурного режима, установленного изготовителем, в соответствии с установленными правилами перевозок. Наборы, транспортированные с нарушением температурного режима, использованию не подлежат.		
	Наборы реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С.		
	Допускается транспортирование: при температуре от 9 до 25 °С	не более 10 сут	
	при температуре от 26 до 30 °С	не более 5 сут	
13.4.	Условия и сроки хранения рабочих растворов <i>(хранить в чистых флаконах или специальной ёмкости, предназначенной для постановки на ИФА-анализаторах, в защищённом от света месте)</i>		
	Рабочий ПР	при температуре от 2 до 8 °С	не более 28 сут
		при температуре от 18 до 25 °С	не более 14 сут
	Рабочий Конъюгат	при температуре от 2 до 25 °С	не более 12 ч
	СС	при температуре от 2 до 25 °С	не более 10 ч
13.5.	Условия и сроки хранения неиспользованных реагентов набора после вскрытия.		
	Хранить в сухом, защищённом от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.		
	Иммуносорбент	После вскрытия неиспользованные стрипы без рамки поместить в фольгированный пакет (не удаляя силикагель!) и тщательно герметизировать. Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и поместить фольгированный пакет со стрипами в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock.	в течение срока годности набора реагентов
	Конъюгат, РРК, К+1, К+2, К-, АНТИ-НВs-ПЛЮС, АНТИ-НВs-МИНУС, ПР, Стоп-реагент, СБ, ТМБ	Флаконы плотно закрыть винтовыми крышками и хранить в упаковке производителя.	в течение срока годности набора реагентов

XIV. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ И РЕМОНТ

Набор реагентов «ДС-ИФА-НВsAg» техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

XV. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

- Производитель (изготовитель) Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» (ООО «НПО «Диагностические системы»), 603157, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Коминтерна, 47. Почтовый адрес: 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, 22.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемого продукта требованиям нормативной и технической документации.
Безопасность и качество набора реагентов гарантируются в течение всего установленного срока годности.
- Гарантии производителя не распространяются при нарушении условий хранения и транспортирования, а также в случае несоблюдения инструкции по применению.
- Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес производителя:

ООО «НПО «Диагностические системы»

603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, 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. образцов плазмы/сыворотки пациента,
3. протоколов исследований с указанием серии набора реагентов, производителя и сроков годности.

XVI. ОБЪЯСНЕНИЕ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СИМВОЛОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		
	Изготовитель		Обратитесь к инструкции по применению
	Номер по каталогу		Предел температуры
	Содержимого достаточно для проведения <i>n</i> тестов (количество определений)		Не допускать воздействия солнечного света
	Код партии (номер серии)		Беречь от влаги
	Дата изготовления (YYYY-MM)		Внимание
	Срок годности (дата истечения срока годности в формате YYYY-MM-DD)		Верх
	Не использовать при повреждении упаковки		Хрупкое, обращаться осторожно

Директор по производству

ООО «НПО «Диагностические системы», к.б.н.



В.К. Пименов

Краткая схема
для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (комплекты 1, 2, 3)
(допускается использование как формы записи)

REF:	Серия:
Годен до:	Дата проведения:

Этапы проведения анализа		Отметка о выполнении
Выдержать набор реагентов		не менее 30 мин, (18-25) °C ☐
Приготовить Рабочий ПР		1 часть ПР (x25) + 24 части H ₂ O ☐
Внести К-, К+1, К+2		В лунки Иммуносорбента по 100 мкл: 1-2 строки – 2 лунки К-, 1 лунка К+1, 2 лунки К+2; 3 строки и более – 4 лунки К-, 1 лунка К+1, 3 лунки К+2 ☐
Внести Исследуемые образцы		В остальные лунки Иммуносорбента по 100 мкл ☐
Приготовить Рабочий Конъюгат*		1 часть Конъюгат (x11) + 10 частей РРК ☐
Внести Рабочий Конъюгат		по 50 мкл в каждую лунку ☐
Инкубировать (выбрать процедуру 1 или 2 или 3)		1) накрыть пленкой, (37,0±1,0) °C, 2 часа или 18 часов ☐
		2) 500 об/мин, (42,0±1,0) °C, 1 час ☐
		3) 500 об/мин, (37,0±1,0) °C, 1 час 30 мин ☐
Промыть Рабочим ПР		по 500 мкл 4 раза в каждую лунку ☐
Приготовить Субстратную смесь (СС)		1 часть ТМБ (x11) + 10 частей СБ ☐
Внести СС		по 100 мкл в каждую лунку ☐
Инкубировать		(18-25) °C, в темноте, 20 мин или (37,0±1,0) °C, в темноте, 15 мин ☐
Внести Стоп-реагент		по 150 мкл в каждую лунку ☐
Измерить ОП (через 2-3 мин)		при 450/620-680 нм или 450 нм ☐
Рассчитать ОПкрит. Провести оценку результатов.		☐

* **Внимание!** При постановке с инкубацией в течение 18 часов (процедура 1 – (термостат (37,0 ± 1,0) °C) объем концентрата Конъюгата (x11) для приготовления рабочего Конъюгата может быть изменен. Кратность концентрата Конъюгата указана на дополнительной этикетке, на внутренней стороне фасовочной коробки.

Постановку осуществлять по одной и той же процедуре. Сочетание процедур не допускается!

Выполнил (ФИО)		(подпись)
Проверил (ФИО)		(подпись)

Краткая схема
для подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В (комплект 4)
(допускается использование как формы записи)

REF:	Серия:
Годен до:	Дата проведения:

Этапы проведения анализа		Отметка о выполнении
Выдержать набор реагентов	 не менее 30 мин, (18-25) °C	☐
Приготовить Рабочий ПР	 1 часть ПР (x25) + 24 части H ₂ O	☐
Внести К-, К+1	 В лунки Иммуносорбента по 100 мкл: в 5 лунок К-, в 3 лунки К+1	☐
Внести Исследуемые образцы	 В остальные лунки Иммуносорбента: каждый образец в 2 лунки по 100 мкл	☐
Внести АНТИ-НВs-ПЛЮС и АНТИ-НВs-МИНУС	 В одну лунку с К-, К+1 и каждым исследуемым образцом по 25 мкл АНТИ-НВs-МИНУС. В другую лунку с К-, К+1 и каждым исследуемым образцом по 25 мкл АНТИ-НВs-ПЛЮС.	☐
Приготовить Рабочий Конъюгат*	 1 часть Конъюгат (x11) + 10 частей РРК	☐
Внести Рабочий Конъюгат	 по 50 мкл в каждую лунку	☐
Инкубировать (выбрать процедуру 1 или 2 или 3)	 1) накрыть пленкой, (37,0±1,0) °C, 2 часа или 18 часов	☐
	2) 500 об/мин, (42,0±1,0) °C, 1 час	☐
	3) 500 об/мин, (37,0±1,0) °C, 1 час 30 мин	☐
Промыть Рабочим ПР	 по 500 мкл 4 раза в каждую лунку	☐
Приготовить Субстратную смесь (СС)	 1 часть ТМБ (x11) + 10 частей СБ	☐
Внести СС	 по 100 мкл в каждую лунку	☐
Инкубировать	 (18-25) °C, в темноте, 20 мин или (37,0±1,0) °C, в темноте, 15 мин	☐
Внести Стоп-реагент	 по 150 мкл в каждую лунку	☐
Измерить ОП (через 2-3 мин)	 при 450/620-680 нм или 450 нм	☐
Рассчитать ОПкрит. Провести оценку результатов.		

* **Внимание!** При постановке с инкубацией в течение 18 часов (процедура 1 – (термостат (37,0±1,0) °C) объем концентрата Конъюгата (x11) для приготовления рабочего Конъюгата может быть изменен. Кратность концентрата Конъюгата указана на дополнительной этикетке, на внутренней стороне фасовочной коробки.

Постановку осуществлять по одной и той же процедуре. Сочетание процедур не допускается!

Выполнил (ФИО)		(подпись)
Проверил (ФИО)		(подпись)





Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью

9 (деветь) листов(а)
цифрами прописью

Заместитель генерального директора _____ Шлюндин О.Н.

личная подпись

Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью

9 (деветь) листов(а)
цифрами прописью

Проректор по научной работе

ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, д.м.н.

Благоднравова А.С.

личная подпись

