



В.Ю.Борисов

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Тест-система иммуноферментная для выявления антител
к core-антигену вируса гепатита В»
"ИФА-антиHBscore"

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления антител к core-антигену вируса гепатита В» "ИФА-антиHBscore" предназначен для качественного выявления суммарных антител к core-антигену вируса гепатита В (HBscoreAg) в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики *in vitro*.

Показания и противопоказания к применению изделия

Изделие предназначено для обследования больных с симптомами вирусного гепатита В, лиц из группы риска и/или контактировавших с носителем или больным вирусным гепатитом В.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Гепатит В (HBV, ВГВ) — антропонозное вирусное заболевание, вызываемое возбудителем с выраженными гепатотропными свойствами — вирус гепатита В из семейства гепаднавирусов.

Основной механизм передачи - парентальный. Пути передачи: половой, перинатальный, гемотрансфузионный, при медицинских процедурах. К группе риска относятся реципиенты донорской крови и ее препаратов; больные, нуждающиеся в проведении хронического гемодиализа; лица, подвергающиеся многократным лечебно-диагностическим и инструментальным процедурам с повреждением кожи и слизистых оболочек; а также медицинский персонал, имеющий профессиональный контакт с кровью больных, лица, практикующие внутривенное введение психотропных препаратов и ведущие беспорядочный половой образ жизни.

Core-антиген— в свободном виде (в сыворотке, плазме) не определяется, обнаружить его можно только гистохимическими методами. Определение антител к core- антигену имеет важное диагностическое значение. Антитела класса IgM к core- антигену начинают вырабатываться еще до клинических проявлений, указывают на активную репликацию вируса. Они появляются в крови через 3-5 недель, сохраняются в течение 2-5 месяцев и исчезают в период выздоровления. Антитела класса IgG начинают вырабатываться с 4-6-го месяца и могут сохраняться пожизненно. Подтверждают контакт организма с вирусом.

Своевременная диагностика гепатита и вовремя начатое лечение позволяют избежать развития заболевания, возникновения осложнений, перехода болезни в хроническую форму.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	НВcoreAg, сорбированный на 96-луночном раз- борном полистироловом планшете для иммуноло- гических реакций с плоским дном	Комплект №1	Комплект №2
		1 планшет	1 планшет
допускается раздельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)			
Контрольный положи- тельный образец (K⁺)	инактивированный; сыворотка крови человека, содержащая антитела к НВcoreAg, слабоопалес- цирующая прозрачная жидкость с желтым оттен- ком различной интенсивности	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)
Контрольный отрица- тельный образец (K⁻)	инактивированный; сыворотка крови человека, не содержащая антитела к НВcoreAg, слабоопалес- цирующая прозрачная жидкость с желтым оттен- ком различной интенсивности	1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (1,0 мл)
Конъюгат (10-кратный концентрат)	моноклональные антитела класса IgG к НВcoreAg, меченные пероксидазой хрена; прозрачная жид- кость красного цвета допускается опалесценция и незначительный осадок	1 фл. (1,3 мл)	-
Конъюгат		-	1 фл. (13 мл)
Раствор для разведе- ния конъюгата (РРК)	опалесцирующая жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, допускается выпадение незначительного осадка	1 фл. (13 мл)	-
25-кратный концен- трат фосфатно- солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцвет- ная, пенящаяся жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	1фл. (40 мл.)	1фл. (40 мл.)
Хромоген (ТМБ)	раствор тетраметилбензидина; прозрачная бес- цветная жидкость без посторонних включений, розового цвета	1 фл. (1,0 мл)	-
Цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБР)	прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 фл. (16 мл)	-
Раствор индикаторный (РИ)	прозрачная бесцветная жидкость	-	1 фл. (16 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (12,5 мл)	1 фл. (12,5 мл)
Одноразовые наконечники для автоматических пипеток		16 шт.	16 шт.

Примечания. 1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(x25), ЦБР, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты. Допускается использование разных серий этих реагентов или их смешение.

3. Допускается использование ТМБ из разных серий набора.

4 K^+ , K^- не содержат антитела к ВГС, ВИЧ-1,2.

5. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Набор укомплектован принадлежностями:

Вспомогательными пластиковыми (ПВХ) емкостями

– 4 шт.

Клейкой пленкой для планшета

– 4 шт.

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовые комплектации набора позволяют одномоментное исследование 96 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 3 лунки). Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Число исслед. образцов	1-3	4-11	12-19	20-27	28-35	36-43	44-51	52-59	60-67	68-75	76-83	84-91

Методы стерилизации изделия

Изделие не требует стерилизации.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемом образце антител к HbcoreAg они и антитела конъюгата конкурируют за HbcoreAg иммуносорбента, что снижает интенсивность цветной реакции с хромогеном (ТМБ) вплоть до ее полного отсутствия. Интенсивность окрашивания измеряется спектрофотометрически.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность набора определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих антитела к HbcoreAg (СОП⁺-042) как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность набора определяется по стандартной панели сывороток предприятия, не содержащих антитела к HbcoreAg (СОП-042) как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 99,06% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая чувствительность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 97,23 % - 100%

Плазма крови человека: 98,58% - 100%

Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,63% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность для каждого вида биологического материала составила:

Сыворотка крови человека: 99,3 % - 100%

Плазма крови человека: 99,24% - 100%

Воспроизводимость – 100%.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Нативная сыворотка, плазма (с гепарином, ЭДТА, цитратом натрия) крови человека объемом не менее 10 мкл.

Сбор биологического материала должен производиться в соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 «Обеспечение качества клинических лабораторных исследований».

Образцы до исследования хранить при температуре от 2 до 8 °С. При необходимости хранения образцов более 7 дней рекомендуется разделить их на аликвоты и хранить при температуре от минус 20 до минус 70 °С. Размороженные образцы перед исследованием нужно тщательно перемешать. При работе с размороженными образцами следует учитывать, что каждый цикл оттаивания-замораживания приводит к разрушению выявляемых антител, снижая качество исследуемого материала. С целью получения достоверных результатов исследования рекомендуется использовать только однократное замораживание-оттаивание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.), ГОСТ 31508.

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003).

РРК содержит фенол; ЦБР, конъюгат - мертиолят в безопасной концентрации. Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» относится к классу А - отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными и классу Б (эпидемиологически опасные отходы) – инфицированные и потенциально инфицированные отходы, материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с 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".

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

"РУЧНАЯ" ПОСТАНОВКА

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин,

Термостат на 37 °С,

Термостатируемый шейкер на 700 об/мин, поддерживающий температуру ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$),
Анализатор иммуноферментный,
Холодильник бытовой, фильтровальная бумага.
Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25°C .

2.1. Приготовление раствора для отмывки планшетов (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в концентрате его необходимо прогреть перед разведением при 37°C до полного растворения осадка.

ФСБ-Т(х25) развести водой очищенной в 25 раз, используя объемы концентрата и воды очищенной, указанные в табл. 1 для заданного числа стрипов.

Таблица 1

Кол-во стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т(х25),мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищ., мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8°C не более 190 сут, при температуре от 18 до 25°C – не более 30 суток.

Приготовление рабочего разведения конъюгата (Комплект №1)

Готовить не менее чем за 10 мин до использования. конъюгат (концентрат х10) развести в РРК, используя объемы реагентов, указанные в табл. 2 для заданного числа стрипов. Необходимый объем РРК перенести в одноразовую емкость и добавить конъюгат (концентрат х10) в указанном количестве, тщательно перемешать.

Таблица 2

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Конъюгат (концентрат х10), мкл	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200
РРК, 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

Стабильность рабочего разведения конъюгата при температуре от 18 до 25°C не более 13ч.

Приготовление субстратно-индикаторного раствора (Комплект №1)

Готовить перед использованием в месте, защищенном от воздействия прямого солнечного света. ТМБ развести в ЦБР в соотношении 1:20, используя объемы ТМБ и ЦБР, указанные в табл. 3 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 3

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ТМБ, мкл	65	130	195	260	325	390	455	520	585	650	715	780
ЦБР, мл	1,3	2,6	3,9	5,2	6,5	7,8	9,1	10,4	11,7	13,0	14,3	15,6

Стабильность субстратно-индикаторного раствора при температуре от 18 до 25°C не более 13 ч. в защищенном от света месте.

Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, K^+ , K^- , конъюгат (Комплект №2), РИ (Комплект №2), стоп-реагент – готовы к применению.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Проведение ИФА

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из пакета планшет, вскрыв выше замка «zip-lock», и установить на рамку необходимое для проведения ИФА количество стрипов. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник.

Хранение вскрытого иммуносорбента возможно при температуре 2-8°С до истечения срока годности набора.

2. Внести в одну лунку (напр., A1) 50 мкл K^+ , в две лунки (напр., B1, C1) – по 50 мкл K^- . В остальные лунки внести по 50 мкл исследуемых образцов.

3. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (Комплект №2) или рабочего разведения конъюгата (Комплект №1). Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой.

Инкубировать 1 ч при 37 °С на шейкере (700 об/мин).

4. По окончании инкубации аспирировать содержимое лунок и промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором в режиме «overflow» или 7 раз промывочным раствором при отсутствии режима «overflow», добавляя в каждую лунку не менее 400 мкл жидкости. Время между заполнением и аспирацией (замачивание) должно быть не менее 30 сек.

Рекомендуется использовать:

- режим отмытки с переполнением – «overflow» - с внесением в лунки по 600-700 мкл рабочего промывочного раствора;

- поперечную аспирацию раствора из лунок – режим «crosswise».

Необходимо следить за полной аспирацией после каждого цикла отмытки (остаточный объем в лунках не должен превышать 10 мкл).

Сохранность иммуносорбента между операциями 15 минут.

5. Во все лунки внести по 150 мкл субстратно-индикаторного раствора (Комплект №1) или РИ (Комплект №2), немедленно поместить планшет в защищенное от света место и выдерживать 25 мин при комнатной температуре.

6. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился субстратно-индикаторный раствор или РИ) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и приступить к регистрации результатов (ОП реакционной смеси после внесения стоп-реагента стабильна не более 10 мин).

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при следующих условиях:

среднее значение ОП в лунках с K^+ не более 0,4;

среднее значение ОП в лунках с K^- в 5 и более раз выше среднего значения ОП $_{K^+}$.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Рассчитать "пороговое" значение ОП (ОП $_{пор}$) по формуле

$$ОП_{пор} = \frac{ОП_{K-ср}}{2},$$

где ОП $_{K-ср}$ – среднее значение ОП в лунках с K^- .

Интерпретация результатов

Исследуемые образцы учитывают как положительные, если ОП соответствующего образца (ОП_{обр}) равна или меньше ОП_{пор}, и как отрицательные, если ОП_{обр} больше ОП_{пор}.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Замораживание не допускается.

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Транспортирование

Замораживание не допускается.

При температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления антител к соге-антигену вируса гепатита В» "ИФА-антиНВсоге" соответствует ТУ 9398-042-70423725-2020, Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности. По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, 1А. ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным, для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия, потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Директор ЗАО "ЭКОлаб".

по научной работе

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор ООО

«ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

«01» 03 2021 г.



С.Г.Марданлы



П.К. Варнавичус

**КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА
(ИФА-антиHbcore)**

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в лунку A1 50 мкл K ⁺ , в лунки B1, C1 по 50 мкл K; в остальные лунки – по 50 мкл исследуемых образцов
Внести	во все лунки по 100 мкл конъюгата (Комплект №2) или рабочего разведения конъюгата (Комплект №1)
Инкубация	1 ч, 37 °C на шейкере (700 об/мин)
Промыть	5 раз промывочным раствором в режиме «overflow» или 7 раз промывочным раствором при отсутствии режима «overflow»
Внести	по 150 мкл субстратно-индикаторного раствора (Комплект №1) или РИ (Комплект №2) в каждую лунку
Инкубация	25 мин, 18-25 °C
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» – по воздуху

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ

«01» 03 2021 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМЧЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус Г.К.



Пронумеровано, пронумеровано
и скреплено печатью

8 лист

Ген. Директор ЗАО "ЭКОлаб"
Борисов В.Ю.
«01» 03 2021 г.

