



**EKVITESTLAB LLC**

Velyka Vasylkivska St. 114  
03150 Kyiv, Ukraine  
Tel. 0-800-31-89-87  
e-mail: [info@equitest.com.ua](mailto:info@equitest.com.ua)  
[www.equitest.com.ua](http://www.equitest.com.ua)

## **STATEMENT**

We, EKVITESTLAB LLC, having a registered office at Velyka Vasylkivska street 114, Kyiv, 03150, Ukraine assign SRL SANMEDICO having a registered office at A. Corobceanu street 7A, apt. 9, Chişinău MD-2012, Moldova, as authorized representative in correspondence with the conditions of directive 98/79/EEC.

We declare that the company mentioned above is authorized to register, notify, renew or modify the registration of medical devices on the territory of the Republic of Moldova.

Date: 03 January 2024

Signature: \_\_\_\_\_  
Director, Anna Yurchuk



**Сертифікат**  
Certificate

№ Q1M 804 255 C1



Система управління якістю виробника:  
Quality management system of manufacturer

**Товариство з обмеженою відповідальністю**  
**«ЕКВІТЕСТЛАБ»**  
**«EKVITESTLAB» Limited Liability Company**

Місцезнаходження юридичної особи: вул. Велика Васильківська 114, м. Київ, 03150, Україна  
Location of the legal entity: 114 Velyka Vasylkivska St., Kyiv, 03150, Ukraine  
Фактичне місцезнаходження: Україна, 03057, м. Київ, проспект Берестейський 60/2  
Actual location: 60/2 Beresteysky Avenue, Kyiv, 03057, Ukraine

Відповідає вимогам:  
meets the requirements of

**ДСТУ EN ISO 13485:2018**  
**Вироби медичні. Системи управління якістю.**  
**Вимоги щодо регулювання**  
**(EN ISO 13485:2016, IDT; ISO 13485:2016, IDT**  
**Medical devices – Quality management systems –**  
**Requirements for regulatory purposes)**

Сфера застосування:  
Scope

**Проектування, розробка, виробництво, зберігання та реалізація ІФА-наборів**  
**для діагностики in vitro**  
Design, development, production, storage and sale of ELISA kits for in vitro diagnostics

Сертифікат виданий ТОВ «Український Інститут Стандартів», місцезнаходження: будинок 1,  
вулиця Олександрівська, місто Київ, 03062, Україна.  
Атестат акредитації НААУ від 30 червня 2020 року № 80141.  
Certificate is issued by LLC Ukrainian Standards Institution: building 1, Oleksandrivska street, Kyiv, 03062, Ukraine.  
Accreditation certificate registered on June 30, 2020 No. 80141

Рішення №: 255-000  
Decision No.:

Дійсний з: 01.04.2024  
Effective date:

Дата видачі: 01.04.2024  
Issue date:

Дійсний до: 31.03.2027  
Expiry date:



Директор  
Director

**Наталія СТЕПАНКІВСЬКА**  
Natalia STEPANKIVSKA

80141  
Сертифікація систем  
менеджменту

Сертифікат чинний за умови проведення щорічного наглядового аудиту.  
Чинність сертифікату необхідно перевірити на офіційному веб-сайті  
[www.usi.biz.ua](http://www.usi.biz.ua) або за телефоном: +38-050- 818-7-333  
Certificate is valid if the annual surveillance audit has been conducted  
The validity of the certificate shall be checked on the official website  
[www.usi.biz.ua](http://www.usi.biz.ua) or by tel.: +38-050- 818-7-333



---

# HBsAg

**ИФА-набор для качественного обнаружения  
поверхностного антигена вируса гепатита В**

---

Инструкция по применению



IVD

REF  
EI-011

$\Sigma$  96  
анализов

  
UA.TR.061



# EQUI HBsAg

ИФА-набор для качественного обнаружения поверхностного антигена вируса гепатита В

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «EQUI HBsAg» предназначен для качественного обнаружения поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики гепатита В и скрининга донорской крови. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и для автоматического иммуноферментного анализатора «открытого» типа.

**Целевая группа:** доноры; лица-потребители инъекционных наркотиков; реципиенты крови или органов; беременные женщины; дети, рожденные от инфицированных матерей; лица, инфицированные ВИЧ; пациенты с симптомами заболеваний печени; пациенты гемодиализа.

**Применение:** ИФА-набор применяется в клинических диагностических лабораториях, станциях переливания крови, а также в других учреждениях, работающих в области *in vitro* диагностики.

## 2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Одним из распространенных заболеваний печени является гепатит В. Его этиологический агент – вирус гепатита В (ВГВ). ВГВ относится к семейству *Нepadnaviridae* и содержит двухцепочечную ДНК. Инфекционной формой вируса являются так называемые частицы Дейна диаметром 42-49 nm, в белковом составе которых основными являются поверхностный антиген (HBsAg) и коровой антиген (HBcAg).

Клиническая картина гепатита В не позволяет диагностировать его длительное время и отличить от других вирусных гепатитов. Поэтому для скрининговых исследований и подтверждения диагноза важную роль играет лабораторная диагностика, особенно выявление антигенов ВГВ и антител к ним методом ИФА. Первым и основным маркером гепатита В является HBsAg, проявляющийся в крови через 3-5 недель после инфицирования. Приблизительно в то же время в крови можно обнаружить ДНК ВГВ и HBeAg, который считается маркером активной репликации вируса и «заразности» крови. ВОЗ рекомендует проводить проверку всей донорской крови на HBsAg, чтобы предотвратить трансмиссивную передачу ВГВ. Через 2-3 недели после появления HBsAg появляются антитела IgM к коровому антигену HBcAg, а вскоре после них – анти-HBcore IgG, быстро достигающие высоких уровней. Выздоровление от острого гепатита В сопровождается выведением вируса из организма, перестают выявляться HBsAg и анти-HBc IgM, появляются антитела к HBeAg. Антитела IgG к коровому антигену персистируют в течение всей жизни и являются маркером имеющегося или перенесенного гепатита В, их уровень в крови снижается медленно. Через несколько месяцев после

исчезновения из крови HBsAg начинают выявляться анти-HBs антитела, свидетельствующие о перенесенном гепатите В и наличии иммунитета. В период «серологического окна» между выводом HBsAg и появлением анти-HBs антител маркером инфекции ВГВ являются суммарные антитела к коровому антигену, также могут проявляться анти-HBe антитела.

Если после острой фазы не происходит элиминация вируса и не появляются анти-HBs антитела, развивается хронический гепатит В. HBsAg продолжает определяться более 6 месяцев, его количество в крови может значительно колебаться. На репликативной стадии хронического гепатита В находится ДНК вируса и HBeAg, антител к HBeAg нет.

ВОЗ рекомендует диагностировать острый гепатит В при наличии HBsAg и антител IgM к HBeAg, а хронический – при устойчивом присутствии HBsAg в течение не менее шести месяцев.

Главным средством профилактики гепатита В является вакцинация, рекомендованная в первую очередь новорожденным. После вакцинации организмом продуцируются анти-HBs антитела и формируется иммунитет у лиц, не соприкасавшихся с вирусом гепатита В. Наличие анти-HBs антител на уровне более 10 IU/l (МЕ/л) принято считать нижним пределом протективного иммунитета вследствие вакцинации или перенесенного гепатита В.

### **3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА**

Обнаружение HBsAg в ИФА-наборе «EQUI HBsAg» базируется на принципе «сэндвич»-варианта твердофазного ИФА в одноэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы моноклональные антитела, специфические к HBsAg. В каждую лунку добавляются образцы сыворотки или плазмы пациента и конъюгат специфических к HBsAg антител с пероксидазой хрена. Во время инкубации исследуемых образцов и пероксидазного конъюгата в лунках планшета HBsAg, при наличии в образцах, связывается как с первыми антителами на твердой фазе, так и со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, образуя «сэндвич» антитело-антиген-антитело. Несвязанные компоненты удаляются при отмывании. Иммуные комплексы обнаруживаются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству HBsAg в образце.

## **4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **4.1. Состав набора**

### Планшет ИФА

STRIPS

1 x 96  
лунок

В каждой лунке планшета засорбированы моноклональные антитела к HBsAg. Лунки можно отделять. После первого открытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не более 6 месяцев

### Позитивный контроль

CONTROL +

1 x 1,6 ml

Раствор поверхностного антигена вируса гепатита В в буфере с альбумином и консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C

### Негативный контроль

CONTROL -

2 x 1,6 ml

Негативная сыворотка крови человека с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C

### Конъюгат (11x концентрат)

CONJ 11x

1 x 0,8 ml

11-кратный концентрат конъюгата моноклональных антител к HBsAg с пероксидазой хрена в буферном растворе со стабилизаторами и консервантом (фиолетовый). Развести конъюгат (11x) 1:11 раствором для разведения конъюгата перед использованием (например, 50 µl концентрата + 500 µl раствора для разведения конъюгата, достаточно для 8 лунок). Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 1 суток

### Раствор для разведения конъюгата

DIL CONJ

1 x 8 ml

Буферный раствор с белками сыворотки крови крупного рогатого скота и иммуноглобулинами мыши с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C

### Раствор ТМБ (готов к использованию)

SOLN TMB

1 x 13 ml

Раствор ТМБ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

### Раствор для промывки TWEEN (20x концентрат)

TWEEN WASH 20x

1 x 50 ml

20-кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 (бесцветный). Развести раствор для промывки TWEEN (20x) 1:20 дистиллированной или деионизированной водой (например, 5 ml концентрата + 95 ml воды для 8 лунок) перед использованием. Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток

### Стоп-раствор (готов к использованию)

SOLN STOP

1 x 13 ml

Раствор 0,5 mol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

В состав набора входят: клейкая пленка (1 шт.), схема внесения образцов (1 шт.), лист контрольных испытаний и инструкция по применению.

## 4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники к ним, мерная лабораторная посуда (10–1000 ml), деионизированная или дистиллированная вода, термошейкер на 37°C или термостат на 42°C, автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер), спектрофотометр (ридер) для микропланшетов на 450/620–695 nm, соответствующие контейнеры для отходов потенциально зараженного материала, таймер, фильтровальная бумага, одноразовые неопудренные перчатки, дезинфицирующие средства.

## 5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

### 5.1. Предостережение

*Перед проведением анализа внимательно ознакомьтесь с инструкцией по применению. Достоверность результата зависит от четкого следования процедуре анализа.*

- не используйте компоненты ИФА-набора после окончания срока годности;
- не используйте во время анализа и не смешивайте компоненты разных серий, компоненты из наборов разных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с набором «EQUI HBsAg»;
- не замораживайте ИФА-набор или его компоненты;
- после использования реагента закрывайте каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролируйте наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз используйте новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегайте попадания прямых солнечных лучей на реагенты ИФА-набора;
- [SOLN|TMB] должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегайте контакта [SOLN|TMB] с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно выполосканную дистиллированной водой посуду;
- не используйте реагенты, цвет которых не соответствует указанному в пункте 4.1;
- ни в коем случае не используйте одну и ту же посуду для раствора конъюгата и [SOLN|TMB];
- не проводите визуальный учет результатов анализа (без использования ридера);
- дополнительное оборудование, находящееся в непосредственном контакте с биологическим материалом или компонентами набора, считается загрязненным и нуждается в очищении и обеззараживании;



- ИФА-набор предназначен для 96 анализов. Компоненты после использования и остатки неиспользованных компонентов должны быть утилизированы.

## 5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для лабораторного профессионального применения в *in vitro* диагностике и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых неопудренных перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате проведения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- [CONTROL+] ИФА-набора «EQUI HBsAg» содержит очищенный поверхностный антиген вируса гепатита В, выделенный с инаktivированным прогреванием сыворотки крови человека, в которой не было обнаружено антител к ВИЧ1/2, ВГС и *Treponema pallidum*, однако работать с контролем следует как с потенциально инфекционным материалом;
- [CONTROL-] ИФА-набора «EQUI HBsAg» протестирован и признан отрицательным на HBsAg и антитела к ВИЧ1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однако обращаться с контролем и исследуемыми образцами следует как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- некоторые компоненты набора содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых. При попадании [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] и раствора конъюгата на слизистые или кожу, необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем насухо вытереть фильтровальной бумагой. В ином случае кислоту необходимо сначала нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

## 5.3. Инаktivация и утилизация отходов

- жидкие отходы необходимо инаktivировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инаktivировать путем автоклавирования при температуре стерилизации не меньше 132°C;
- не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- утилизацию инаktivированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством.

## 6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

ИФА-набор стабилен в течение срока годности, указанного на этикетке, если его хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать набор при температуре 2-8°C. Допускается одноразовая транспортировка при температуре не выше 23°C в течение двух суток.

## 7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

Кровь необходимо отбирать из вены в стерильную пробирку. Пробирка должна быть промаркирована с указанием идентификационных данных пациента и даты отбора образца. Цельную кровь до отделения сыворотки можно хранить до 24 часов при температуре 2-8°C, не допуская замораживания.

Сыворотку или плазму крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 3 суток. Допускается более продолжительное хранение замороженной сыворотки при температуре -20°C или -70°C. Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освобождаются от нерастворенных включений центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 минут. Не следует использовать образцы сывороток с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным проростом.

Образцы сывороток транспортировать в термоизоляционных контейнерах. Для этого закрытые промаркированные пробирки необходимо поместить в полиэтиленовый пакет, плотно запечатать и положить в центре термokonтейнера. Замороженные хладагенты положить на дно вдоль боковых стенок термokonтейнера и накрыть ими образцы сывороток.

## 8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

*Примечание: Перед использованием выдержите все компоненты ИФА-набора при комнатной температуре 18-25°C в течение 30 минут!*

### 8.1. Подготовка планшета ИФА

Для предупреждения конденсации воды в лунках открывайте **STRIPS** только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Раскройте вакуумную упаковку, отделите необходимое количество лунок, а остальное сразу же тщательно упакуйте с влагопоглотителем и храните плотно закрытыми на замок zip-lock при температуре 2-8°C. Хранение упакованного таким образом планшета обеспечивает его стабильность в течение 6 месяцев.

### 8.2. Приготовление промывочного раствора

Для приготовления раствора для промывания разведите **TWEEN|WASH|20x** 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, потом

перемешайте. Например, 5 ml концентрата + 95 ml воды, чего достаточно для 8 лунок. При наличии кристаллов в концентрате раствора для промывания прогрейте флакон при температуре 37°C до полного растворения кристаллов (15–20 минут). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток.

### 8.3. Приготовление раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата готовится следующим образом: разведите [CONJ]11x (фиолетовый) в чистом флаконе раствором [DIL]CONJ (розовый) в соотношении 1:11 (то есть, 1+10), раствор окрашивается в фиолетовый цвет. Например, для 8 лунок анализа добавить до 500 µl [DIL]CONJ 50 µl [CONJ]11x. Раствор конъюгата в рабочем разведении стабильный в течение суток при условии хранения при температуре 2-8°C.

## 9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (четыре лунки для контролей и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с контролями обязательно включайте в каждую постановку анализа.

9.2. Заполните схему внесения образцов.

9.3. Приготовьте раствор для промывания в соответствии с пунктом 8.2.

9.4. Приготовьте раствор конъюгата согласно пункту 8.3.

9.5. Внесите в лунки по 100 µl контролей и исследуемых образцов:

[CONTROL] + – в лунку A1,

[CONTROL] - – в лунки B1, C1, D1,

в остальные лунки – исследуемые образцы.

9.6. Внесите в лунки по 50 µl раствора конъюгата поверх контролей и исследуемых образцов. Для предотвращения кроссконтаминации образцов внесите раствор конъюгата, не касаясь содержания лунок. Осторожно постукивая по планшету, перемешайте смесь в лунках.

9.7. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 120 минут при 37°C и постоянном орбитальном перемешивании содержимого лунок со скоростью 300 об/мин. *Инкубацию образцов с конъюгатом в лунках ИФА-планшета можно проводить в течение 120 минут при температуре 42°C в статическом режиме. Однако при этом может наблюдаться снижение специфичности анализа.*

9.8. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:

– удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;

– наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;

– аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;

- повторите процедуру промывания еще пять раз;
- после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

- 9.9. Внесите в лунки по 100  $\mu\text{l}$  [SOLN|TMB], не касаясь дна и стенок лунок планшета.
- 9.10. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.
- 9.11. Внесите в лунки стрипов по 100  $\mu\text{l}$  [SOLN|STOP] для остановки ферментативной реакции, придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [SOLN|TMB]. Во время внесения происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором незначительно меняется оттенок.
- 9.12. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения измерения убедитесь в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

*Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае оставьте лунку для установления бланка (в такую лунку внесите только [SOLN|TMB] и [SOLN|STOP]).*

## 10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

### 10.1. Учет результатов анализа

Рассчитать среднее значение ОП негативного контроля ( $\bar{Nc}$ ) уровень граничного значения (Cut off - CO).

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \bar{Nc} + 0,07$$

### 10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они соответствуют следующим требованиям:

$$[CONTROL|+] \quad ОП \geq 1,5$$

$$[CONTROL|-] \quad ОП \leq 0,100$$

$$[CONTROL|-] \quad \bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0 \quad \text{где } Ncn - \text{ОП каждого повтора } Nc$$

Если одно из значений ОП негативного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отбрасывают и рассчитывают  $\bar{Nc}$  по остальным значениям ОП негативного контроля. Если более одного значения ОП негативного контроля не отвечает указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного проведения.

### 10.3. Интерпретация результатов

$OD_{\text{sample}} \geq CO$       ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ

$OD_{\text{sample}} < CO$       ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ\*\* , где  $OD_{\text{sample}}$  – ОП образца

\* Первоначально положительные образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках ИФА-набора «EQUI HBsAg». После повторного тестирования положительными считаются образцы, оптическая плотность которых хотя бы в одном из повторов превышает граничное значение. Если при повторном тестировании оптическая плотность образца в обоих повторах ниже граничного значения, такой образец считать отрицательным.

Результаты для образцов, ОП которых равно граничному значению или находится в пределах  $\pm 10\%$ , следует интерпретировать осторожно. Такие образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках набора «EQUI HBsAg». Если при повторном тестировании  $OD_{\text{sample}}$  снова находится в пределах  $\pm 10\%$  граничного значения, следует провести отбор и анализ нового образца.

\*\* Образцы со значением оптической плотности ниже граничного значения считаются отрицательными в ИФА-наборе «EQUI HBsAg». Однако результаты в пределах 10% ниже граничного значения следует интерпретировать с осторожностью (рекомендуется повторно исследовать такие образцы в двух лунках набора ИФА).

## 11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

### 11.1. Аналитические характеристики

#### Прецизионность

*Воспроизводимость результатов в пределах одной постановки анализа (Intra assay repeatability)*

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с разной концентрацией поверхностного антигена оценивали в 32 повторах на одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП <sub>ср</sub>	CV, %
2	1,809	3,3
45/15	0,922	3,7

*Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)*

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в течение 4 дней в 4 постановках анализа по 8 повторов в каждом анализе.

№ сыворотки	ОП <sub>ср</sub>	CV, %
2	1,827	5,6
45/15	0,936	5,8

### **Аналитическая чувствительность**

Предел чувствительности анализа по обнаружению поверхностного антигена вируса гепатита В определяли на Британском стандартном образце 07/288-010 для HBsAg (Национальный институт биологических стандартов Соединенного королевства, NIBSC) и подтверждали с использованием Третьего Международного Стандарта для HBsAg 12/226 (Third International Standard for HBsAg, производства NIBSC). Предел чувствительности ИФА-набора «EQUI HBsAg» составил 0,05 IU/ml (МЕ/мл).

### **Аналитическая специфичность**

На результат анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,1 mg/ml (172,3 μmol/l), гемоглобина в концентрации до 5 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

### **11.2. Диагностические характеристики**

Для определения клинической чувствительности и специфичности наборов «EQUI HBsAg» использовали 57 образцов сывороток, полученных от пациентов с диагнозом гепатит В, и 294 образца сывороток клинически здоровых доноров (сероотрицательных по отношению к вирусу гепатита В). Кроме того, были использованы образцы из коммерческих панелей производства «SeraCare Life Sciences» (США). По результатам анализа клиническая чувствительность ИФА-набора составляет 100%, клиническая специфичность – 100%.

Исследование характеристик метода по сравнению с аналогичной коммерческой тест-системой проводилось на целевой группе беременных женщин (171 образец). Для выборки беременных женщин относительная специфичность составляла 100%, процент совпадения – 100%.

Положительная прогностическая ценность (PPV) ИФА-набора «EQUI HBsAg» составляет 100%, отрицательная прогностическая ценность (NPV) – 100%.

## **12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА**

Отрицательный результат в ИФА-наборе «EQUI HBsAg» показывает, что тестируемый образец не содержит HBsAg или его концентрация ниже 0,05 IU/ml (МЕ/мл). Поскольку образец может содержать HBsAg в очень низкой концентрации, отрицательный результат в ИФА-наборе «EQUI HBsAg» не позволяет полностью исключить инфицирование вирусом гепатита В.

Кроме того, в литературных источниках описаны некоторые примеры вирусного гепатита В (острого или хронического), когда в образце обнаруживалась вирусная ДНК при отсутствии HBsAg. В таких случаях полезным будет исследование образца на другие маркеры вирусного гепатита В, выявление ДНК и оценка биохимических показателей сыворотки крови пациента.

Для верификации специфичности реакции каждый положительный результат (согласно критериям интерпретации ИФА-набора «EQUI HBsAg») необходимо подтвердить в нейтрализационном ИФА с использованием комплекта реагентов «EQUI HBsAg Confirmation». Для корректной диагностики гепатита В рекомендуется провести исследование образца на наличие специфических антител классов IgM и IgG к HBcore антигену и антител к HBsAg (например, в ИФА-наборах «EQUI HBcore IgM», «EQUI HBcore IgG» и «EQUI anti-HBs», соответственно).

В целях нивелирования ложноположительных результатов, вызванных наличием в образцах сывороток крови человека антител, специфических к иммуноглобулинам мыши, в ИФА-наборе используется специальный блок-компонент, препятствующий формированию иммунных комплексов с антимышиными антителами (англ. НАМА) на твердой фазе.

### **13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА**

***Высокий фон в лунках всего планшета может возникнуть из-за:***

- загрязненного промывателя;
- низкого качества или загрязнения воды;
- использования плохо помытой посуды;
- использования дезинфицирующих средств, содержащих хлор;
- использования загрязненных наконечников;
- увеличения времени инкубации или изменения температурного режима.

***Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:***

- повторным внесением раствора ТМБ;
- загрязнением конуса автоматической пипетки раствором конъюгата;
- загрязнением одного из каналов промывателя.

***Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:***













- неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (раствор конъюгата или раствор ТМБ);
- сокращено время инкубации на одном из этапов.

***Интенсивность окрашивания лунок не соответствует полученной оптической плотности.*** Это может свидетельствовать о смещенном оптическом луче.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mahoney F.J. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection // *Clinical Microbiology Review* – 1999. – Vol.12, N 2 - P.351–366.
2. Maddrey W.C. Hepatitis B - an important public health issue // *Clin. Lab.* - 2001. - Vol. 47, N 1-2. - P.51-55.
3. Spradling P.R., Xing J., Williams R. et al. Immunity to Hepatitis B Virus (HBV) Infection Two Decades after Implementation of Universal Infant HBV Vaccination: Association of Detectable Residual Antibodies and Response to a Single HBV Challenge Dose // *Clinical and Vaccine Immunology.* - 2013. - Vol.20, N 4. - P.559–561.
4. Walsh K., Alexander G.J.M. Update on chronic viral hepatitis // *Postgraduate Medical Journal* - 2001. - V. 77. - P. 498-505.
5. Возіанова Ж.І. Вірусний гепатит В // *Інфекційні та паразитарні хвороби: В 3 т. – К.:»Здоров'я», 2001. т.1. – С.601-614.*
6. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Systematic review on hepatitis B and C prevalence in the EU/EEA. Stockholm: 2016.
7. CDC Hepatitis B Information // <https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/index.htm>.
8. World Health Organization (WHO). WHO guidelines on hepatitis B and C testing. Geneva: World Health Organization; 2017 // <http://www.who.int/hepatitis/publications/guidelines-hepatitis-c-b-testing/en/>
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on *in vitro* diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU
10. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України.* - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// [https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part\\_iii4.htm](https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm)
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



	Производитель
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Номер по каталогу
	Дата изготовления
	Использовать до
	Код партии
	Температурное ограничение
	Содержит достаточно для (n-) испытаний
	Предостережение, ознакомьтесь с сопроводительными документами
	Ознакомление с инструкцией по применению
	Беречь от прямых солнечных лучей
	Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 8 от 21.09.2021г.

*С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:*



ООО «Эквитестлаб»  
ул. Большая Васильковская 114, г. Киев, Украина, 03150

проспект Победы 60/2, г. Киев, Украина, 03057  
(адрес производства)

тел.: 0 (800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,  
e-mail: [info@equitest.com.ua](mailto:info@equitest.com.ua), [www.equitest.com.ua](http://www.equitest.com.ua)

## СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

Внести по 100 µl контролей и исследуемых образцов в лунки:  
A1 – [CONTROL+], B1, C1, D1 – [CONTROL-],  
E1 и в остальные лунки - исследуемые образцы

В лунки стрипов внести по 50 µl приготовленного 1:11 (1+10) раствора конъюгата.  
(фиолетовый цвет)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **120 мин при температуре 37°C** и постоянном орбитальном перемешивании содержимого лунок со скоростью 300 об/мин

Промыть лунки 6 раз приготовленным 1:20 (1+19) промывным раствором TWEEN (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|TMB]

Инкубировать на протяжении **30 min в темноте при температуре 18-25°C**

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|STOP]  
(происходит изменение цвета с голубого на желтый)

## УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = \bar{Nc} + 0,07;$$

$\bar{Nc}$  - Среднее значение ОП 3-х [CONTROL-]

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$OD_{\text{sample}} \geq CO$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$OD_{\text{sample}} < CO$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



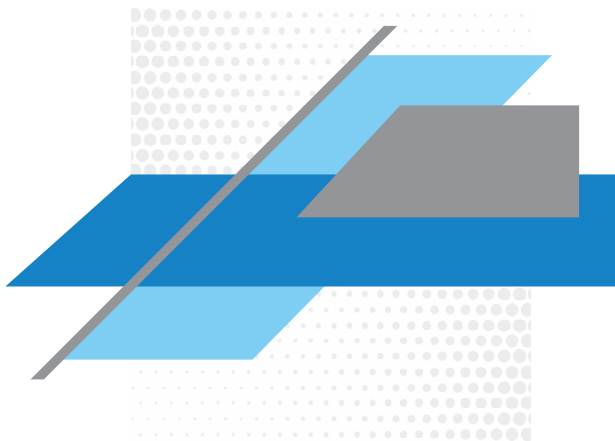
---

# anti-HBcore

**ИФА-набор для качественного определения  
суммарных антител к коровому антигену вируса  
гепатита В**

---

Инструкция по применению



IVD

REF  
EI-014

$\Sigma$  96  
анализов

  
UA.TR.061



# EQUI anti-HBcore

ИФА-набор для качественного определения суммарных антител к коровому антигену вируса гепатита В

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

ИФА-набор («EQUI anti-HBcore») предназначен для качественного определения суммарных антител к коровому антигену вируса гепатита В (ВГВ) в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики гепатита В. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и для автоматического иммуноферментного анализатора «открытого» типа.

**Целевая группа:** доноры; лица-потребители инъекционных наркотиков; реципиенты крови или органов; беременные женщины; дети, рожденные от инфицированных матерей; лица, инфицированные ВИЧ; пациенты с симптомами заболеваний печени.

**Применение:** ИФА-набор применяется в клинических диагностических лабораториях, в станциях переливания крови, а также в других учреждениях, работающих в области *in vitro* диагностики.

## 2. 2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Одним из самых распространенных заболеваний печени является гепатит В. Его этиологический агент – вирус гепатита В (ВГВ). ВГВ относится к семейству *Hepadnaviridae* и содержит двухцепочечную ДНК. Инфекционной формой вируса являются так называемые «частицы Дейна» диаметром 42-49 нм, в белковом составе которых основными являются поверхностный антиген (HBsAg) и коревой антиген (HBcAg).

Клиническая картина гепатита В не позволяет диагностировать его длительное время и отличить от других вирусных гепатитов. Поэтому для скрининговых исследований и подтверждения диагноза важную роль играет лабораторная диагностика, особенно выявление антигенов ВГВ и антител к ним методом ИФА. Первым и основным маркером гепатита В является HBsAg, который обнаруживается в крови через 3-5 недель после инфицирования. Примерно в то же время в крови можно обнаружить ДНК ВГВ и HBeAg, который считается маркером активной репликации вируса и («заразности») крови. ВОЗ рекомендует проводить проверку всей донорской крови на HBsAg, чтобы предотвратить трансмиссивной передачи ВГВ. Через 2-3 недели после появления HBsAg появляются антитела IgM к коровому антигену HBcAg, а вскоре после них – анти-HBcore IgG, которые быстро достигают высоких уровней. Выздоровление от острого гепатита В сопровождается выводом вируса из организма, перестают проявляться HBsAg и анти- HBc IgM, появляются антитела к HBeAg. Антитела IgG к коровому антигену персистируют в течение всей жизни и является маркером имеющегося или перенесенного гепатита В, их уровень в крови снижается медленно. Через несколько месяцев после исчезновения из крови HBsAg начинают проявляться анти-HBs антитела, которые являются свидетельством перенесенного гепатита В и наличия иммунитета. В период «серологического окна» между выводом HBsAg и появлением анти-HBs антител маркером инфекции ВГВ является суммарные антитела к коровому антигену, также могут проявляться анти-HBe антитела.

Если после острой фазы не происходит элиминация вируса и не появляются анти-HBs антитела, развивается хронический гепатит В. HBsAg продолжает определяться более 6 месяцев, его количество в крови может значительно колебаться. На репликативной стадии хронического гепатита В оказывается ДНК вируса и HBeAg, антител к HBeAg нет.

ВОЗ рекомендует диагностировать острый гепатит В по наличию HBsAg и антител IgM к HBcAg, а хронический - за стойким присутствием HBsAg в течение не менее шести месяцев.

Главным средством профилактики гепатита В является вакцинация, которая рекомендована в первую очередь новорожденным. После вакцинации организмом вырабатываются анти-HBs антитела и формируется иммунитет у лиц, которые не

сталкивались с вирусом гепатита В. Наличие анти-НВs антител на уровне более 10 IU/l (МО/л) принято считать нижней границей протективного иммунитета вследствие вакцинации или перенесенного гепатита В.

### 3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Выявление специфических к коровому антигену вируса гепатита В антител в ИФА-наборе «EQUI anti-HVcore» базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбирован рекомбинантный HVcore антиген вируса гепатита В. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках планшета ИФА специфичные к HVcore антигена антитела, если они присутствуют в образцах, связываются с антигенами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных антител, остаются только специфические комплексы антиген-антитело. После этого добавляется смесь конъюгатов антивидовых (анти-IgG и анти-IgM) моноклональных антител с пероксидазой хрена, которые связываются с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Комплексы антиген-антитело определяются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-ти минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695 nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

## 4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

### 4.1. Состав набора

STRIPS	1 x 96 лунок	<b>Планшет ИФА</b> В каждой лунке планшета засорбирован рекомбинантный HVcore антиген вируса гепатита В. Лунки можно отделять. После первого вскрытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не больше 6 месяцев
CONTROL +	1 x 0,35 ml	<b>Позитивный контроль</b> Раствор иммуноглобулинов человека, специфичных к HVcore антигена, с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C
CONTROL -	1 x 1,2 ml	<b>Негативный контроль</b> Отрицательная сыворотка крови человека с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C
DIL SAMPLE	1 x 11 ml	<b>Раствор для разведения сывороток</b> Буферный раствор с экстрактом молока, детергентом и консервантом (коричневый). Хранить при температуре 2-8°C
SOLN CONJ	1 x 13 ml	<b>Раствор конъюгата (готовый к использованию)</b> Буферный раствор моноклональных антител к IgG и IgM человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, со стабилизаторами и консервантом (зеленый). Хранить при температуре 2-8°C
SOLN TMB	1 x 13 ml	<b>Раствор ТМБ (готовый к использованию)</b> Раствор ТМБ, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

#### Раствор для промывки TWEEN (20x концентрат)

TWEEN|WASH|20x 1 x 50 ml

20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 (бесцветный). Развести раствор для промывки TWEEN (20x) 1:20 дистиллированной или деионизированной водой (например, 5 ml концентрата + 95 ml воды для 8 лунок) перед использованием. Разведенный раствор хранить при температуре 2-8°C не больше 7 суток

SOLN|STOP 1 x 13 ml

#### Стоп-раствор (готовый к использованию)

Раствор 0,5 mol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

В состав набора также входят: клейкая пленка (2 шт.), схема внесения образцов (1 шт.), лист контрольных испытаний и инструкция по применению.

### 4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники к ним, мерная лабораторная посуда (10–1000 ml), деионизированная или дистиллированная вода, термостат на 37°C, автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер), спектрофотометр (ридер) для микропланшетов на 450/620-695 nm, соответствующие контейнеры для отходов потенциально зараженного материала, таймер, фильтровальная бумага, одноразовые неопудренные перчатки, дезинфицирующие средства.

## 5. 5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

### 5.1. Предостережения

Перед проведением анализа внимательно ознакомьтесь с инструкцией по применению. Достоверность результата зависит от четкого следования процедуре анализа.

- не используйте компоненты ИФА-набора после окончания срока годности;
- не используйте во время анализа и не смешивайте компоненты разных серий, компоненты из наборов разных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с набором «EQUI anti-HVcore»;
- не замораживайте ИФА-набор или его компоненты;
- после использования реагента закрывайте каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролируйте наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз используйте новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегайте попадания прямых солнечных лучей на реагенты ИФА-набора;
- SOLN|TMB должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегайте контакта SOLN|TMB с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно выполосканную дистиллированной водой посуду;
- не используйте реагенты, цвет которых не соответствует указанному в пункте 4.1;
- ни в коем случае не используйте одну и ту же посуду для SOLN|CONJ и SOLN|TMB
- не проводите визуальный учет результатов анализа (без использования ридера);
- дополнительное оборудование, находящееся в непосредственном контакте с биологическим материалом или компонентами набора, считается загрязненным и нуждается в очищении и обеззараживании;
- ИФА-набор предназначен для 96 анализов. Компоненты после использования и остатки неиспользованных компонентов должны быть утилизированы.

## 5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для лабораторного профессионального применения в *in vitro* диагностике и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых неопудренных перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате проведения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- контроли ИФА-набора «EQUI anti-HBscore» протестированы и признаны отрицательными на HBsAg и антитела к ВИЧ1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однако работать с контролями и исследуемым материалом необходимо как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- некоторые компоненты набора содержат низкие концентрации вредных веществ и могут спровоцировать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] и [SOLN|CONJ] на слизистые оболочки или кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем насухо вытереть фильтровальной бумагой. В ином случае кислоту необходимо сначала нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

## 5.3. Инактивация и утилизация отходов

- жидкие отходы необходимо инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре стерилизации не меньше 132°C;
- не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- утилизацию инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством.

## 6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

ИФА-набор стабилен в течение срока годности, указанного на этикетке, если его хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать набор при температуре 2-8°C. Допускается одноразовая транспортировка при температуре не выше 23°C в течение двух суток.

## 7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ

Кровь необходимо отбирать из вены в стерильную пробирку. Пробирка должна быть промаркирована с указанием идентификационных данных пациента и даты отбора образца. Цельную кровь до отделения сыворотки можно хранить до 24 часов при температуре 2-8°C, не допуская замораживания.

Сыворотку или плазму крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 3 суток. Допускается более продолжительное хранение замороженной сыворотки при температуре -20°C или -70°C. Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освобождаются от нерастворенных включений центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 минут. Не следует использовать



образцы сывороток с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным проростом.

Образцы сывороток транспортировать в термоизоляционных контейнерах. Для этого закрытые промаркированные пробирки необходимо поместить в полиэтиленовый пакет, плотно запечатать и положить в центре термоконтнера. Замороженные хладагенты положить на дно вдоль боковых стенок термоконтнера и накрыть ими образцы сывороток.

## 8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

*Примечание: Перед использованием выдержите все компоненты ИФА-набора при комнатной температуре 18-25°C в течение 30 минут!*

### 8.1. Подготовка планшета ИФА

Для предупреждения конденсации воды в лунках открывайте **STRIPS** только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Раскройте вакуумную упаковку, отделите необходимое количество лунок, а остальное сразу же тщательно упакуйте с влагопоглотителем и храните плотно закрытыми на замок zip-lock при температуре 2-8°C. Хранение упакованного таким образом планшета обеспечивает его стабильность в течение 6 месяцев.

### 8.2. Приготовление раствора для промывания

Для приготовления раствора для промывания разведите **TWEEN WASH 20x** 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, потом перемешайте. Например, 5 ml концентрата + 95 ml воды, чего достаточно для 8 лунок. При наличии кристаллов в концентрате раствора для промывания прогрейте флакон при температуре 37°C до полного растворения кристаллов (15–20 минут). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток.

## 9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (четыре лунки для контролей и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с контролями обязательно включайте в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполните схему внесения образцов.
- 9.3. Приготовьте раствор для промывания в соответствии с пунктом 8.2
- 9.4. Внесите во все лунки планшета по 80 µl **DIL SAMPLE**.
- 9.5. Внесите в лунки по 20 µl контролей и исследуемых образцов:  
**CONTROL +** – в лунку A1,  
**CONTROL -** – в лунки B1, C1, D1,  
в остальные лунки – исследуемые образцы.  
Во время внесения происходит изменение цвета раствора с коричневого на синий. Осторожно пипетируйте смесь в лунках, не допуская пенообразования.
- 9.6. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.7. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
  - удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
  - наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;
  - аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;
  - повторите процедуру промывания еще четыре раза;

– после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

- 9.8. Внесите в лунки по 100  $\mu\text{l}$  [SOLN|CONJ]. Стрипы накройте новой клейкой плёнкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.9. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
- 9.10. Внесите в лунки по 100  $\mu\text{l}$  [SOLN|TMB], не касаясь дна и стенок лунок планшета.
- 9.11. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.
- 9.12. Внесите в лунки стрипов по 100  $\mu\text{l}$  [SOLN|STOP] для остановки ферментативной реакции, придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [SOLN|TMB]. Во время внесения происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором незначительно меняется оттенок.
- 9.13. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения измерения убедитесь в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пухырьков.

Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае оставьте лунку для установления бланка (в такую лунку внесите только [SOLN|TMB] и [SOLN|STOP]).

## 10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

### 10.1. Учет результатов анализа

Рассчитайте среднее значение ОП негативного контроля ( $\bar{Nc}$ ) и уровень граничного значения (Cut off - CO).

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \bar{Nc} + 0,2$$

### 10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они соответствуют следующим требованиям:

[CONTROL|+] ОП  $\geq 1,5$

[CONTROL|-] ОП  $\leq 0,100$

[CONTROL|-]  $\bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0$  где  $Ncn$  – ОП каждого повтора  $Nc$

Если одно из значений ОП негативного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отбрасывают и рассчитывают  $\bar{Nc}$  по остальным значениям ОП негативного контроля. Если более одного значения ОП негативного контроля не отвечает указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного проведения.

### 10.3. Интерпретация результатов

$OD_{sample} \geq CO$  ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ\*

$OD_{sample} < CO$  ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ, где  $OD_{sample}$  - ОП образца

\* Первоначально положительные образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках ИФА-набора «EQUI anti-HVcore». После повторного тестирования положительными считаются образцы, оптическая плотность которых хотя бы в одном из повторов превышает пороговое значение. Если при повторном тестировании

оптическая плотность образца в обоих повторах ниже предельного значения, такой образец считать отрицательным.

Результаты для образцов, ОП которых равна предельному значению или находится в пределах  $\pm 10\%$ , следует интерпретировать осторожно. Такие образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках набора «EQUI anti-HVcore». Если при повторном тестировании  $OD_{\text{sample}}$  снова находится в пределах  $\pm 10\%$  от предельного значения, следует провести отбор и анализ нового образца.

## 11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

### 11.1. Аналитические характеристики

#### Прецизионность

Воспроизводимость результатов в пределах одной постановки анализа (*Intra assay repeatability*)

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с различной концентрацией anti-HVcore антител оценивали в 32 повторах на одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП <sub>ср</sub>	CV, %
38/25	1,066	4,7
67/10	1,311	6,1

Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (*Inter assay reproducibility*)

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с различной концентрацией anti-HVcore антител оценивали в течение 4 дней в 4 постановках анализа, по 8 повторов в каждом анализе.

№ сыворотки	ОП <sub>ср</sub>	CV, %
38/25	1,094	6,8
67/10	1,293	7,0

#### Аналитическая специфичность

На результат анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,21 mg/ml (361,8  $\mu\text{mol/l}$ ), гемоглобина в концентрации до 10 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

### 11.2. Диагностические характеристики

Для определения клинической чувствительности ИФА-наборов «EQUI anti-HVcore» использовали 57 образцов сывороток от пациентов, больных гепатитом В. По результатам анализа клиническая чувствительность ИФА-набора «EQUI anti-HVcore» составляет 100%.

Исследование характеристик метода по сравнению с аналогичным коммерческим ИФА-набором проводили на целевой группе беременных женщин и выборке доноров (всего 414 образцов). Для этих образцов относительная специфичность наборов «EQUI anti-HVcore» составляла 99,5%, процент совпадения - 99,0%.

## 12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Интерпретация результатов должна проводиться с учетом клинических проявлений и данных комплекса лабораторных исследований. Для диагностики острого, хронического или перенесенного гепатита В, оценки эффективности терапии рекомендуется дополнительно провести исследования образца на другие маркеры ВГВ, выявления ДНК и оценку биохимических показателей крови пациента.

Положительный результат в ИФА-наборе «EQUI anti-HVcore» является свидетельством наличия у пациента антител к корового антигена вируса гепатита В. Анти-HVcore антитела не являются показателем протективного иммунитета. Выявление антител к HVcore антигена у пациента не является доказательством наличия ВГВ в организме, эти

антитела обнаруживаются при остром, хроническом и перенесенном в анамнезе гепатите В.

Отрицательный результат в ИФА-наборе «EQUI anti-HBcore» не исключает инфицирование пациента вирусом гепатита В, особенно на ранних стадиях ВГВ инфекции.

Для корректной диагностики гепатита В рекомендуется провести исследование образца на наличие HBsAg и антител к HBsAg (например, в ИФА-наборах «EQUI HBsAg» и «EQUI anti-HBs»), соответственно).

### **13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА**

**Высокий фон в лунках всего планшета может возникнуть из-за:**

- загрязненного промывателя;
- низкого качества или загрязнения воды;
- использования плохо помытой посуды;
- использования дезинфицирующих средств, содержащих хлор;
- использования загрязненных наконечников;
- увеличения времени инкубации или изменения температурного режима.

**Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:**

- повторным внесением розчину ТМБ;
- загрязнением конуса автоматической пипетки раствором конъюгата;
- загрязнением одного из каналов промывателя.

**Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:**

- неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (раствор конъюгата или раствор ТМБ);
- сокращено время инкубации на одном из этапов.

**Интенсивность окрашивания лунок не соответствует полученной оптической плотности.** Это может свидетельствовать о смещенном оптическом луче.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mahoney F.J. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection // *Clinical Microbiology Review* – 1999. – Vol.12, N 2 - P.351–366.
2. Maddrey W.C. Hepatitis B - an important public health issue // *Clin. Lab.* - 2001. - Vol. 47, N 1-2. - P.51-55.
3. Spradling P.R., Xing J., Williams R. et al. Immunity to Hepatitis B Virus (HBV) Infection Two Decades after Implementation of Universal Infant HBV Vaccination: Association of Detectable Residual Antibodies and Response to a Single HBV Challenge Dose // *Clinical and Vaccine Immunology.* - 2013. - Vol.20, N 4. - P.559–561.
4. Walsh K., Alexander G.J.M. Update on chronic viral hepatitis // *Postgraduate Medical Journal* - 2001. - V. 77. - P. 498-505.
5. Возіанова Ж.І. Вірусний гепатит В // *Інфекційні та паразитарні хвороби: В 3 т.* – К.: «Здоров'я», 2001. т.1. – С.601-614.
6. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Systematic review on hepatitis B and C prevalence in the EU/EEA. Stockholm: 2016.
7. CDC Hepatitis B Information // <https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/index.htm>.
8. World Health Organization (WHO). WHO guidelines on hepatitis B and C testing. Geneva: World Health Organization; 2017 // <http://www.who.int/hepatitis/publications/guidelines-hepatitis-c-b-testing/en/>.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України.* - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// *Finnish National Public Health Institute 2002*// [https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part\\_iii4.htm](https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm)
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Производитель



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Дата изготовления



Использовать до



Код партии



Температурное ограничение



Содержит достаточно для (n-) испытаний



Предостережение, ознакомьтесь с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 7 от 10.12.2021г.

*С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:*



ООО «Эквитестлаб»

ул. Большая Васильковская 114, г. Киев, Украина, 03150

проспект Победы 60/2, г. Киев, Украина, 03057 (адрес производства)

тел.: 0 (800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,

e-mail: [info@equitest.com.ua](mailto:info@equitest.com.ua), [www.equitest.com.ua](http://www.equitest.com.ua)



## СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

В лунки планшета внести по 80 µl **[DIL|SAMPLE]**  
(коричневый цвет)

Внести по 20 µl контролей и исследуемых образцов в лунки:  
A1 – **[CONTROL|+]**, B1, C1, D1 – **[CONTROL|-]**,  
E1 и в остальные лунки - исследуемые образцы  
(происходит изменение цвета с коричневого на синий)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **30 min при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) раствором для промывания TWEEN (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl **[SOLN|CONJ]**  
(зеленый цвет)

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **30 min при температуре 37°C**

Промыть лунки 5 раз приготовленным 1:20 (1+19) раствором для промывания TWEEN (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl **[SOLN|TMB]**

Инкубировать в течение **30 min в темноте при температуре 18-25°C**

В лунки стрипов внести по 100 µl **[SOLN|STOP]**  
(происходит изменение цвета с голубого на желтый)

Измерить оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при 450/620-695 nm

## УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

$$N_c = (N_{c1} + N_{c2} + N_{c3})/3;$$

$$CO = N_c + 0,2;$$

$N_c$  - Среднее значение ОП 3-х **[CONTROL|-]**

$CO$  - Уровень граничного значения (Cut off)

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$OD_{sample} \geq CO$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$OD_{sample} < CO$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ





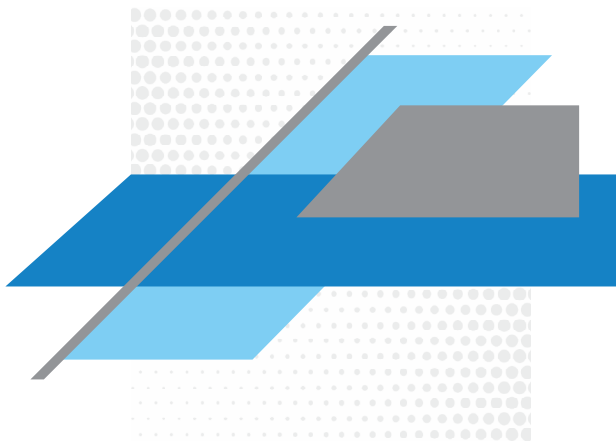
---

# anti-HBs

**ИФА-набор качественного определения  
суммарных антител к поверхностному антигену  
вируса гепатита В**

---

Инструкция по применению



IVD

REF  
EI-017

$\Sigma$  96  
анализов

  
UA.TR.061



# EQUI anti-HBs

ИФА-набор для качественного определения суммарных антител к поверхностному антигену вируса гепатита В

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

ИФА-набор «EQUI anti-HBs» предназначен для качественного определения суммарных антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью диагностики перенесенного гепатита В и оценки протективного иммунитета. Использование комплекта калибраторов «EQUI anti-HBs Calibrators» с набором «EQUI anti-HBs» позволяет проводить количественное определение суммарных антител к HBsAg. Процедура анализа рассчитана как для ручной постановки с автоматическими пипетками и стандартным оборудованием, так и для автоматического иммуноферментного анализатора «открытого» типа.

**Целевая группа:** доноры; лица-потребители инъекционных наркотиков; реципиенты крови или органов; беременные женщины; дети, рожденные от инфицированных матерей; лица, инфицированные ВИЧ; пациенты с симптомами заболеваний печени.

**Применение:** ИФА-набор применяется в клинических диагностических лабораториях, в станциях переливания крови, а также в других учреждениях, работающих в области *in vitro* диагностики.

## 2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Одним из самых распространенных заболеваний печени является гепатит В. Его этиологический агент - вирус гепатита В (ВГВ). ВГВ относится к семейству *Herpesviridae* и содержит двухцепочечную ДНК. Инфекционной формой вируса являются так называемые «частицы Дейна» диаметром 42-49 нм, в белковом составе которых основными являются поверхностный антиген (HBsAg) и коревой антиген (HBeAg).

Клиническая картина гепатита В не позволяет диагностировать его длительное время и отличить от других вирусных гепатитов. Поэтому для скрининговых исследований и подтверждения диагноза важную роль играет лабораторная диагностика, особенно выявления антигенов ВГВ и антител к ним методом ИФА. Первым и основным маркером гепатита В является HBsAg, который обнаруживается в крови через 3-5 недель после инфицирования. Примерно в то же время в крови можно обнаружить ДНК ВГВ и HBeAg, который считается маркером активной репликации вируса и «заразности» крови. ВОЗ рекомендует проводить проверку всей донорской крови на HBsAg, чтобы предотвратить трансмиссивной передачи ВГВ. Через 2-3 недели после появления HBsAg появляются антитела IgM к коровому антигену HBeAg, а вскоре после них – анти HBeAg IgG, которые быстро достигают высоких уровней. Выздоровление от острого гепатита В сопровождается выводом вируса из организма, перестают проявляться HBsAg и анти-HBe IgM, появляются антитела к HBeAg. Антитела IgG

к коровому антигену персистируют в течение всей жизни и являются маркером имеющегося или перенесенного гепатита В, их уровень в крови снижается медленно. Через несколько месяцев после исчезновения из крови HBsAg начинают проявляться анти-HBs антитела, которые являются свидетельством перенесенного гепатита В и наличия иммунитета. В период «серологического окна» между выводом HBsAg и появлением анти-HBs антител маркером инфекции ВГВ является суммарные антитела к коровому антигену, также могут проявляться анти-HBe антитела.

Если после острой фазы не происходит элиминация вируса и не появляются анти-HBs антитела, развивается хронический гепатит В. HBsAg продолжает определяться более 6 месяцев, его количество в крови может значительно колебаться. На репликативной стадии хронического гепатита В оказывается ДНК вируса и HBeAg, антител к HBeAg нет.

ВОЗ рекомендует диагностировать острый гепатит В с наличием HBsAg и антител IgM к HBsAg, а хронический - за стойким присутствием HBsAg в течение не менее шести месяцев.

Главным средством профилактики гепатита В является вакцинация, которая рекомендована в первую очередь новорожденным. После вакцинации организмом вырабатываются анти-HBs антитела и формируется иммунитет у лиц, которые не сталкивались с вирусом гепатита В. Наличие анти-HBs антител на уровне более 10 IU / л (МЕ / л) принято считать нижней границей протективного иммунитета вследствие вакцинации или перенесенного гепатита В.

### **3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА**

Выявление специфических антител к HBsAg в ИФА-наборе «EQUI anti-HBs» базируется на принципе «непрямого» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбирован рекомбинантный HBsAg субтипов ad та ау. В каждую лунку добавляются образцы сыворотки или плазмы пациента и конъюгат рекомбинантных белков - аналогов HBsAg, с пероксидазой хрена. Во время инкубации, в случае наличия антител к HBsAg в образце, на твердой фазе формируется комплекс антиген-антитело-антиген («сэндвич»). Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Иммунные комплексы оказываются путем добавления раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-ти минутной инкубации реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450 / 620-695nm. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

### **4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

#### **4.1. Состав набора**

### Планшет ИФА

STRIPS

1 x 96  
лунок

В лунках планшета засорбированы рекомбинантные белки - аналоги HBsAg субтипов ad та ay. Лунки можна отделять. После первого вскрытия храните неиспользованные стрипы в упаковке при температуре 2-8°C не больше 6 месяцев.

### Позитивный контроль

CONTROL +

1 x 1,6 ml

Раствор специфичных HBsAg иммуноглобулинов с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C

### Отрицательный контроль

CONTROL -

2 x 1,6 ml

Отрицательная сыворотка крови с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C

### Конъюгат (11x концентрат)

CONJ|11x

1 x 0,6 ml

11-ти кратный концентрат конъюгата рекомбинантных HBsAg субтипов ad и ay с пероксидазой хрена в буферном растворе со стабилизаторами (фиолетовый).

Развести конъюгат (11x) 1:11 раствором для разведения конъюгату перед использованием (например, 30 µl концентрата + 300 µl раствора для разведения, достаточно для 8 лунок). Разведенный раствор хранить при температуре 2-8 °C не более 1 суток.

### Раствор для розведения конъюгата

DIL|CONJ

1 x 6 ml

Буферный раствор с белками плазмы крови крупного рогатого скота, детергентом и консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C

### Раствор ТМБ (готовый к использованию)

SOLN|TMB

1 x 13 ml

Раствор ТМБ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

### Раствор для промывки TWEEN (20x концентрат)

TWEEN|WASH|20x

1 x 50 ml

20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 (бесцветный). Развести раствор для промывки TWEEN (20x) 1:20 дистиллированной или деионизированной водой (например, 5 ml концентрата + 95 ml воды для 8 лунок) перед использованием. Разведенный раствор хранить при температуре 2-8°C не больше 7 суток.

### Стоп-раствор (готовый к использованию)

SOLN|STOP

1 x 13 ml

Раствор 0,5 mol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

В состав набора также входят: клейкая пленка (2 шт.), схема внесения образцов (1 шт.), лист контрольных испытаний и инструкция по применению.

## 4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

Автоматические пипетки переменного объема на 10–1000 µl и наконечники для них, мерная лабораторная посуда (10–1000 ml), деионизированная или дистиллированная вода, термостат на 37°C, деионизированная или дистиллированная вода, термостат на 450/620-695 nm, соответствующие контейнеры для отходов потенциально зараженного материала, таймер, фильтровальная бумага, одноразовые неопудренные перчатки, дезинфицирующие средства.

## 5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

### 5.1. Предостережения

*Перед проведением анализа внимательно ознакомьтесь с инструкцией по использованию. Достоверность результата зависит от четкого следования процедуре анализа.*

- не используйте компоненты ИФА-набора после окончания срока годности;
- не используйте во время анализа и не смешивайте компоненты разных серий, компоненты из наборов разных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с набором «EQUI anti-HBs»;
- не замораживайте ИФА-набор или его компоненты;
- после использования реагента закрывайте каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролируйте наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз используйте новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- избегайте попадания прямых солнечных лучей на реагенты ИФА-набора;
- **SOLN|TMB** должен быть бесцветным перед использованием. Если раствор окрашен в синий или желтый цвет, его нельзя использовать. Избегайте контакта **SOLN|TMB** с металлами или ионами металлов. Для работы используйте только чистую, тщательно выполосканную дистиллированной водой посуду;
- не используйте реагенты, цвет которых не соответствует указанному в пункте 4.1;
- ни в коем случае не используйте одну и ту же посуду для раствора конъюгата и **SOLN|TMB**;
- не проводите визуальный учет результатов анализа (без использования ридера);
- дополнительное оборудование, находящееся в непосредственном контакте с биологическим материалом или компонентами набора, считается загрязненным и нуждается в очищении и обеззараживании;

- ИФА-набор предназначен для 96 анализов. Компоненты после использования и остатки неиспользованных компонентов должны быть утилизированы.

## 5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для лабораторного профессионального применения в *in vitro* диагностике и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в одноразовых неопудренных перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате проведения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- контроли ИФА-набора «EQUI anti-HBs» протестированы и признаны отрицательными на HBsAg и антитела к ВИЧ1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однако работать с контролями и исследуемым материалом необходимо как с потенциально опасным инфекционным материалом;
- некоторые компоненты набора содержат низкие концентрации вредных веществ и могут спровоцировать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] и раствора конъюгата на слизистые оболочки или кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем насухо вытереть фильтровальной бумагой. В ином случае кислоту необходимо сначала нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

## 5.3. Инактивация и утилизация отходов

- жидкие отходы необходимо инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре стерилизации не меньше 132°C;
- не автоклавируйте растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- утилизацию инактивированных отходов проводить в соответствии с действующим национальным законодательством.

## 6. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

ИФА-набор стабилен в течение срока годности, указанного на этикетке, если его хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать набор при температуре 2-8°C. Допускается одноразовая транспортировка при температуре не выше 23°C в течение двух суток.

## **7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ ОБРАЗЦОВ**

Кровь необходимо отбирать из вены в стерильную пробирку. Пробирка должна быть промаркирована с указанием идентификационных данных пациента и даты отбора образца. Цельную кровь до отделения сыворотки можно хранить до 24 часов при температуре 2-8°C, не допуская замораживания.

Сыворотку или плазму крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 3 суток. Допускается более продолжительное хранение замороженной сыворотки при температуре -20°C или -70°C. Замороженные образцы перед использованием следует разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освобождаются от нерастворенных включений центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 минут. Не следует использовать образцы сывороток с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным проростом.

Образцы сывороток транспортировать в термоизоляционных контейнерах. Для этого закрытые промаркированные пробирки необходимо поместить в полиэтиленовый пакет, плотно запечатать и положить в центре термоконтейнера. Замороженные хладагенты положить на дно вдоль боковых стенок термоконтейнера и накрыть ими образцы сывороток.

## **8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

*Примечание: Перед использованием выдержите все компоненты ИФА-набора при комнатной температуре 18-25°C в течение 30 минут!*

### **8.1. Подготовка планшета ИФА**

Для предупреждения конденсации воды в лунках открывайте **STRIPS** только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Раскройте вакуумную упаковку, отделите необходимое количество лунок, а остальное сразу же тщательно упакуйте с влагопоглотителем и храните плотно закрытыми на замок zip-lock при температуре 2-8°C. Хранение упакованного таким образом планшета обеспечивает его стабильность в течение 6 месяцев.

### **8.2. Приготовление промывочного раствора**

Для приготовления раствора для промывания разведите **TWEEN|WASH|20x** 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, потом перемешайте. Например, 5 ml концентрата + 95 ml воды, чего достаточно для 8 лунок. При наличии кристаллов в концентрате раствора для промывания прогрейте флакон при температуре 37°C до полного растворения кристаллов (15–20 минут). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток.



### 8.3. Приготовление раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата готовится следующим образом: разведите  (фиолетовый) в чистом флаконе раствором  (розовый) в соотношении 1:11 (то есть, 1+10), раствор окрашивается в фиолетовый цвет. Например, для 8 лунок анализа добавить до 300 µl  30 µl . Раствор конъюгата в рабочем разведении стабильный в течение суток при условии хранения при температуре 2-8°C.

## 9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовьте необходимое количество лунок для анализа (четыре лунки для контролей и необходимое количество для исследуемых образцов), вставьте их в рамку планшета ИФА. Лунки с контролями обязательно включайте в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполните схему внесения образцов.
- 9.3. Приготовьте раствор для промывания в соответствии с пунктом 8.2.
- 9.4. Приготовьте раствор конъюгата согласно пункту 8.3.
- 9.5. Внесите в лунки по 70 µl контролей и исследуемых образцов:  
 – в лунку A1,  
 – в лунки B1, C1, D1,  
в остальные лунки – исследуемые образцы.
- 9.6. Внесите в лунки по 35 µl раствора конъюгата поверх контролей и исследуемых образцов. Для предотвращения кроссконтаминации образцов внесите раствор конъюгата, не касаясь содержания лунок. Осторожно постукивая по планшету, перемешайте смесь в лунках.
- 9.7. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 120 минут при температуре 37°C.
- 9.8. По окончании инкубации аккуратно снимите клейкую пленку и промойте лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
  - удалите содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
  - наполните лунки стрипов не менее чем по 300 µl раствором для промывания, оставьте не менее, чем на 30 секунд;
  - аспирируйте раствор из лунок. Остаточный объем раствора после каждого этапа аспирации должен составлять не больше 5 µl;
  - повторите процедуру промывания еще пять раз;
  - после последней аспирации избавьтесь от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.9. Внесите в лунки по 100 µl , не касаясь дна и стенок лунок планшета.
- 9.10. Инкубируйте стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не используйте клейкую пленку на данном этапе.
- 9.11. Внесите в лунки стрипов по 100 µl  для остановки ферментативной реакции, придерживаясь той же последовательности,

что и при внесении [SOLN|TMB]. Во время внесения происходит изменение цвета раствора с голубого на желтый, в лунках с прозрачным раствором незначительно меняется оттенок.

9.12. Измерьте на ридере ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 nm в течение 5 минут после остановки реакции. До проведения измерения убедитесь в чистоте внешней поверхности дна лунок и отсутствии пузырьков.

*Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 nm, в этом случае оставьте лунку для установления бланка (в такую лунку внесите только [SOLN|TMB] и [SOLN|STOP]).*

## 10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

### 10.1. Учет результатов анализа

Рассчитать среднее значение ОП негативного контроля ( $\bar{Nc}$ ) уровень граничного значения (Cut off - CO).

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \bar{Nc} + 0,2$$

### 10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они соответствуют следующим требованиям:

CONTROL +

$$ОП \geq 1,5$$

CONTROL -

$$ОП \leq 0,100$$

CONTROL -

$$\bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0$$

где Ncn – ОП каждого повтора Nc

Если одно из значений ОП негативного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отбрасывают и рассчитывают  $\bar{Nc}$  по остальным значениям ОП негативного контроля. Если более одного значения ОП негативного контроля не отвечает указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного проведения.

### 10.3. Интерпретация результатов

$$OD_{\text{sample}} \geq CO \quad \text{ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ}$$

$$OD_{\text{sample}} < CO \quad \text{ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ}$$

, где  $OD_{\text{sample}}$  - ОП образца

Результаты для образцов, ОП которых равна граничному значению или находится в пределах  $\pm 10\%$ , следует интерпретировать осторожно. Такие образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках набора «EQUI anti-NBs». Если при повторном тестировании  $OD_{\text{sample}}$  снова находится в пределах  $\pm 10\%$  от граничного значения, следует провести отбор и анализ нового образца.

## 11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

### 11.1. Аналитические характеристики

#### Прецизионность

*Воспроизводимость результатов в пределах одной постановки анализа (Intra assay repeatability)*

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с различной концентрацией anti-HBcore антител оценивали в 32 повторях на одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП <sub>ср</sub>	mIU/ml (мМЕ/мл)	CV, %
103/10	1,654	95,9	3,4
104/24	0,389	16,7	5,1

*Воспроизводимость результатов между разными постановками анализа (Inter assay reproducibility)*

Коэффициент вариации (CV) для двух сывороток с различной концентрацией anti-HBcore антител оценивали в течение 3 дней в 3 постановках анализа, по 8 повторов в каждом анализе.

№ сыворотки	ОП <sub>ср</sub>	mIU/ml (мМЕ/мл)	CV, %
103/10	1,812	102,9	9,9
104/24	0,389	16,8	9,1

#### Аналитическая специфичность

На результат анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,21 mg/ml (361,8 μmol/l), гемоглобина в концентрации до 10 mg/ml и триглицеридов в концентрации до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

### 11.2. Диагностические характеристики

Для определения клинической чувствительности ИФА-наборов «EQUI anti-HBs» использовали 19 образцов сывороток от вакцинированных пациентов и 8 положительных образцов с коммерческой панели сывороток производства SeraCare Life Sciences Inc (США). Клиническая чувствительность наборов «EQUI anti-HBs» составила 100%.

Исследование характеристик метода по сравнению с аналогичным коммерческим ИФА-набором проводили на целевой группе беременных женщин и выборке доноров (168 образцов). Для выборки беременных женщин и доноров относительная специфичность составила 99,3%, процент совпадения составляет 97,6%.

## 12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Положительный результат в ИФА-наборе «EQUI anti-HBs» является свидетельством наличия у пациента антител к поверхностному антигену вируса гепатита В. Антитела к HBsAg являются показателем протективного

иммунитета.

Отрицательный результат в ИФА-наборе «EQUI anti-HBs» показывает, что тестируемый образец не содержит анти-HBs антител или их концентрация ниже уровня чувствительности анализа.

Выявление анти-HBs у пациента не является доказательством наличия вируса гепатита В в организме, эти антитела обнаруживаются при хроническом и перенесенном в анамнезе гепатите В, а также у вакцинированных против гепатита В лиц. Чтобы отличить эти состояния, рекомендуется протестировать пациента на другие маркеры гепатита В и исследовать образец на наличие HBsAg и специфических антител классов IgM и IgG к HBcore антигена (например, в ИФА-наборах «EQUI HBsAg», «EQUI HBcore IgM» и «EQUI HBcore IgG», соответственно).

Для оценки уровня протективного иммунитета рекомендуется определить концентрацию анти-HBs антител в образце с применением комплекта калибраторов «EQUI anti-HBs Calibrators».

### **13. ТРУДНОСТИ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА**

***Высокий фон в лунках всего планшета может возникнуть из-за:***

- загрязненного промывателя;
- низкого качества или загрязнения воды;
- использования плохо помытой посуды;
- использования дезинфицирующих средств, содержащих хлор;
- использования загрязненных наконечников;
- увеличения времени инкубации или изменения температурного режима.

***Высокий фон в отдельных рядах может быть связан с:***

- повторным внесением раствора ТМБ;
- загрязнением конуса автоматической пипетки раствором конъюгата;
- загрязнением одного из каналов промывателя.

***Полученное значение ОП положительного контроля ниже установленной границы, если:***

- неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (раствор конъюгата или раствор ТМБ);
- сокращено время инкубации на одном из этапов.

***Интенсивность окрашивания лунок не соответствует полученной оптической плотности.*** Это может свидетельствовать о смещенном оптическом луче.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mahoney F.J. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection // *Clinical Microbiology Review* – 1999. – Vol.12, N 2 - P.351–366.
2. Maddrey W.C. Hepatitis B - an important public health issue // *Clin. Lab.* - 2001. - Vol. 47, N 1-2. - P.51-55.
3. Spradling P.R., Xing J., Williams R. et al. Immunity to Hepatitis B Virus (HBV) Infection Two Decades after Implementation of Universal Infant HBV Vaccination: Association of Detectable Residual Antibodies and Response to a Single HBV Challenge Dose // *Clinical and Vaccine Immunology.* - 2013. - Vol.20, N 4. - P.559–561.
4. Walsh K., Alexander G.J.M. Update on chronic viral hepatitis // *Postgraduate Medical Journal* - 2001. - V. 77. - P. 498-505.
5. Возіанова Ж.І. Вірусний гепатит В // *Інфекційні та паразитарні хвороби: В 3 т. – К.:»Здоров'я», 2001. т.1. – С.601-614.*
6. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Systematic review on hepatitis B and C prevalence in the EU/EEA. Stockholm: 2016.
7. CDC Hepatitis B Information // <https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/index.htm>.
8. World Health Organization (WHO). WHO guidelines on hepatitis B and C testing. Geneva: World Health Organization; 2017 // <http://www.who.int/hepatitis/publications/guidelines-hepatitis-c-b-testing/en/>.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України.* - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// *Finnish National Public Health Institute 2002//* [https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part\\_iii4.htm](https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm)
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Производитель



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Дата изготовления



Использовать до



Код партии



Температурное ограничение



Содержит достаточно для (n-) испытаний



Предостережение, ознакомьтесь с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 7 от 18.10.2021г.

*С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:*



ООО «Эквигестлаб»

ул. Большая Васильковская 114, г. Киев, Украина, 03150

проспект Победы 60/2, г. Киев, Украина, 03057 (адрес производства)

тел.: 0 (800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,

e-mail: [info@equitest.com.ua](mailto:info@equitest.com.ua), [www.equitest.com.ua](http://www.equitest.com.ua)



## СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

Внести по 70 µl контролей и исследуемых образцов в лунки:  
A1 – [CONTROL+], B1, C1, D1 – [CONTROL-],  
E1 и в остальные лунки - исследуемые образцы

Внести по 35 µl приготовленного 1:11 (1+10) раствора конъюгата

Заклеить стрипы пленкой, инкубировать **120 min при температуре 37°C**

Промыть лунки 6 раз приготовленным 1:20 (1+19) раствором для промывания TWEEN (300 µl в лунку)

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|TMB]

Инкубировать на протяжении **30 min в темноте при температуре 18-25°C**

В лунки стрипов внести по 100 µl [SOLN|STOP]  
(происходит изменение цвета с голубого на желтый)

## УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = \bar{Nc} + 0,2;$$

$\bar{Nc}$  - Среднее значение ОП 3-х [CONTROL-]

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$OD_{\text{sample}} \geq CO$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$OD_{\text{sample}} < CO$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ





ТОВ «ХЕМА» код ЄДРПОУ 36038442  
Адреса 03179, м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23  
Для кореспонденції: 03179, а/с 49  
З питань замовлення продукції: 050-422-62-16, 067-422-62-16  
Тел.: +38 (095) 60-99-555 Факс: +38 (044) 422-62-16  
e-mail: info@xema.com.ua  
www.xema.in.ua

## STATEMENT

We, XEMA LLC, as a manufacturer of in vitro diagnostic medical devices, having a registered office at Akademika Yefremova St. 23, Kyiv, Ukraine assign SRL SANMEDICO having a registered office at A. Corobceanu Street 7A, apt. 9, Chişinău MD-2012, Moldova, as authorized representative in correspondence with legislative requirements of the Republic of Moldova.

We declare that the company mentioned above is authorized to register, notify, renew, or modify the registration of medical devices on the territory of the Republic of Moldova.

This Statement shall come into force on the date of its signing. The duration of this Statement is 3 years from the date of signing.

Date: 06.09.2023

Signature:

*Director Xema LLC*  
*Oleksandra Zavaliei*



# СЕРТИФІКАТ

про відповідність системи управління якістю

Зареєстрований у Реєстрі

«29» червня 2022 р.

№ UA.SM.214-21

Дійсний до «03» серпня 2024 р.

Перше видання: «04» серпня 2021 р.

ЦИМ СЕРТИФІКАТОМ ВІДПОВІДНОСТІ ПОСВІДЧУЄТЬСЯ,  
ЩО СИСТЕМА УПРАВЛІННЯ ЯКОСТІ СТОСОВНО

проектування та розроблення, виробництва та дистрибуції  
медичних виробів для діагностики *in vitro*

впроваджена:

**ТОВ «ХЕМА»**

за адресою: вул. Академіка Єфремова, 23, м. Київ, 03179, Україна

відповідає вимогам ISO 13485:2016;

**ДСТУ EN ISO 13485:2018 (EN ISO 13485:2016, IDT; ISO 13485:2016, IDT).**

Контроль відповідності сертифікованої системи управління якістю вимогам зазначеного стандарту здійснюється шляхом нагляду, періодичність і процедури якого регламентуються процедурами органу з оцінки відповідності.

Сертифікат видано Органом з оцінки відповідності ТОВ «УКРМЕДСЕРТ», акредитованим Національним агентством з акредитації України, атестат від 24.12.2019 № 80047, адреса: вул. Драгоманова, будинок 1-А, оф. 2, м. Київ, 02059, Україна, тел./факс: +38-067-595-02-30, <https://ukrmedcert.org.ua>.

Директор



І.М. Хотенюк



# Certificate

## Of Marketing Authorization of Medical Product

within Germany, the member states of the European Union  
and the other states having a contractual agreement with the European Economic Area

Nr. **AR/IVD/XEMA LLC/01/2023**

Issued on the basis of the Declaration of conformity and registration taking into account Article 11 of Regulation (EU) 2017/746 (IVDR) on In Vitro Diagnostic, and Medical Device Implementing Act (MPDG)

Ausgestellt auf Grund der Konformitätserklärung und Registrierung unter Berücksichtigung der der Verordnung (EU) 2017/746 (IVDR) über In-vitro-Diagnostika und Medizinprodukte-Durchführungsgesetz (MPDG)

Manufacturer / Hersteller

**XEMA LLC**  
UKRAINE, 03179 KYIV  
Akademika Yefremova St. 23  
qa@xema.com.ua; www.xema.in.ua

**SRN: UA-MF-000032959**

Product name / Produkt

**See annex to the Certificate**  
Siehe Anhang zum Zertifikat

Product Classification:  
Produktklassifizierung

**In Vitro Diagnostic Medical Devices**  
In-vitro-Diagnostikum (IVD) Medizinprodukte

Category:  
Kategorie

**Common/ Other IVD**  
Sonstige IVD-Produkte

Conformity assessment procedure:  
Konformitätsbewertungsverfahren:

**EC DECLARATION OF CONFORMITY**  
**(Annex III, except point 6, Directive 98/79/EC)**  
**in connection with article 110(3) IVDR**

**EU- KONFORMITÄTSEKTLARUNG**  
(Anhang III, außer Nummer 6, Richtlinie 98/79 / EG)  
in Verbindung mit Artikel 110 (3) IVDR

State Competent Authority:  
Staatliche Zuständige Behörde

**BfArM** Federal Institute for Drugs and Medical Devices  
DMIDS (German Medical Device Information and Database System)

**BfArM** Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte DMIDS  
(Deutsches Medizinprodukte-Informations- und Datenbanksystem)

Date of issue : **2023-03-07**  
Das Ausstellungsdatum

Valid to : **2025-05-31**  
Gültig bis

Represented in the EC by:

Polmed.de Beata Rozwadowska  
Fichtenstr. 12A, 90763 Fürth, Germany  
email: [info@polmed.de](mailto:info@polmed.de)  
Tel: +49 911 93163967



Polmed.de

**SRN: DE-AR-000006947**

**Annex to the Certificate No.:**

Anhang zum Zertifikat Nr.:

**AR/IVD/XEMA LLC/01/2023**

The following medical devices can be placed on the market in the Federal Republic of Germany, in the member states of the European Economic Community (EEC) and in the other contract states of the agreement about the European Economic Area.

Die folgenden Medizinprodukte in der Bundesrepublik Deutschland, in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft (EG) und in den Vertragsstaaten der EG in den Verkehr gebracht werden dürfen.

#	Nomenclature term Nomenklaturbezeichnung	Catalog No. Katalog-Nr.	Name of device Produktbezeichnung	DMIDS Registration number Registriernummer
1.	ASPERGILLUS	K021	GalMAg EIA	DE/CA64/00115824
2.	HSV IgG	K104	HSV 1/2 IgG EIA	DE/CA64/00115826
3.	HSV IgM	K104M	HSV 1, 2 IgM EIA	DE/CA64/00115833
4.	HSV 2 IgG	K104B	HSV 2 IgG EIA	DE/CA64/00115836
5.	MYCOPLASMA ANTIBODY ASSAYS	K106	Mycoplasma IgG EIA	DE/CA64/00115837
6.	SYPHILIS ANTIBODY ASSAYS TOTAL	K111	anti-Treponema pallidum EIA	DE/CA64/00115839
7.	SYPHILIS ANTIBODY IGG	K111G	Treponema pallidum IgG EIA	DE/CA64/00115840
8.	H. PYLORI ANTIBODY ASSAYS	K119G	Helicobacter pylori IgG EIA	DE/CA64/00115850
9.	OTHER OTHER BACTERIOLOGY IMMUNOASSAY	K126	Ureaplasma IgG EIA	DE/CA64/00115851
10.	THYROID PEROXIDASE (INCL. MICROSOMAL) ANTIBODIES	K131	aTPO EIA	DE/CA64/00115852
11.	THYROGLOBULIN AUTOANTIBODIES	K132	aTG EIA	DE/CA64/00115853
12.	MPO ANCA	K133	aMPO EIA	DE/CA64/00115854
13.	TISSUE TRANSGLUTAMINASE ANTIBODIES	K160 K161	anti-TGlu IgG EIA anti-TGlu IgA EIA	DE/CA64/00115855
14.	GIARDIA LAMBLIA	K171	anti-Giardia lamblia EIA	DE/CA64/00115856
15.	OTHER PARASITOLOGY	K174	Ascaris IgG EIA	DE/CA64/00115857
16.	ECHINOCOCCUS	K175	Echinococcus IgG EIA	DE/CA64/00115858
17.	DISTOMATOSIS	K176	Opisthorchis IgG EIA	DE/CA64/00115859
18.	GLIADIN ANTIBODIES	K180 K181	Gliadin IgG EIA Gliadin IgA EIA	DE/CA64/00115860
19.	IMMUNOGLOBULIN E - TOTAL	K200	Total IgE EIA	DE/CA64/00115861
20.	THYROID STIMULATING HORMONE	K201	TSH EIA	DE/CA64/00115863
21.	LUTEINISING HORMONE	K202	LH EIA	DE/CA64/00115864
22.	FOLLICLE STIMULATING HORMONE	K203	FSH EIA	DE/CA64/00115865
23.	HUMAN GROWTH HORMONE	K204	GH EIA	DE/CA64/00115866
24.	HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN TOTAL	K205	hCG EIA	DE/CA64/00115867
25.	PROLACTIN	K206	Prolactin EIA	DE/CA64/00115868

The above-mentioned medical products are marked with the CE symbol.  
Die oben genannten medizinischen Produkte sind mit dem CE-Zeichen gekennzeichnet.

**Annex to the Certificate No.:**

Anhang zum Zertifikat Nr.:

**AR/IVD/XEMA LLC/01/2023**

The following medical devices can be placed on the market in the Federal Republic of Germany, in the member states of the European Economic Community (EEC) and in the other contract states of the agreement about the European Economic Area.

Die folgenden Medizinprodukte in der Bundesrepublik Deutschland, in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft (EG) und in den Vertragsstaaten der EG in den Verkehr gebracht werden dürfen.

#	Nomenclature term Nomenklaturbezeichnung	Catalog No. Katalog-Nr.	Name of device Produktbezeichnung	DMIDS Registration number Registriernummer
26.	PROGESTERONE	K207	Progesterone EIA	DE/CA64/00115869
27.	ESTRADIOL	K208	Estradiol EIA	DE/CA64/00115870
28.	TESTOSTERONE (WITH DEHYDRO AND FREE TESTOSTERONE)	K209	Testosterone EIA	DE/CA64/00115871
29.	CORTISOL	K210	Cortisol EIA	DE/CA64/00115872
30.	TRIIODOTHYRONINE	K211	T3 EIA	DE/CA64/00115873
31.	THYROXINE	K212	T4 EIA	DE/CA64/00115874
32.	FREE TRIIODOTHYRONINE	K213	ft3 EIA	DE/CA64/00115875
33.	FREE THYROXINE	K214	ft4 EIA	DE/CA64/00115876
34.	DEHYDRO-EPIANDROSTERONE SULPHATE (INCL. DHEA)	K215	DHEAS EIA	DE/CA64/00115877
35.	17 OH PROGESTERONE	K217	17-OH-progesterone EIA	DE/CA64/00115878
36.	ESTRIOL	K218	free Estriol EIA	DE/CA64/00115880
37.	TESTOSTERONE (WITH DEHYDRO AND FREE TESTOSTERONE)	K219	free Testosterone EIA	DE/CA64/00115881
38.	CANCER ANTIGEN 125	K222	CA 125 EIA	DE/CA64/00115882
39.	CANCER ANTIGEN 19-9	K223	CA 19-9 EIA	DE/CA64/00115883
40.	CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN	K224	CEA EIA	DE/CA64/00115884
41.	ALPHAFETOPROTEIN	K225	AFP EIA	DE/CA64/00115885
42.	CANCER ANTIGEN 15-3	K226	CA 15-3 (M12) EIA	DE/CA64/00115886
43.	OTHER OTHER TUMOUR MARKERS	K232	Thyroglobulin EIA	DE/CA64/00115887
44.	β HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN (INCL. SUBUNIT)	K235	free β-HCG EIA	DE/CA64/00115888
45.	CYFRA 21-1	K236	CYFRA 21-1 EIA	DE/CA64/00115889
46.	SQUAMOUS CELL CARCINOMA ANTIGEN	K237	SCC (A) EIA	DE/CA64/00115890
47.	PREGNANCY ASSOCIATED PLASMA PROTEIN - A (DOWNS)	K238	PAPP-A EIA	DE/CA64/00115892
48.	OTHER OTHER TUMOUR MARKERS	K239	HE4 EIA	DE/CA64/00115893
49.	CANCER ANTIGEN 242	K243	CA242 EIA	DE/CA64/00115894
50.	OTHER PREGNANCY TESTING HORMONES	K245	AMH EIA	DE/CA64/00115896

The above-mentioned medical products are marked with the CE symbol.  
Die oben genannten medizinischen Produkte sind mit dem CE-Zeichen gekennzeichnet.

**Annex to the Certificate No.:**

Anhang zum Zertifikat Nr.:

**AR/IVD/XEMA LLC/01/2023**

The following medical devices can be placed on the market in the Federal Republic of Germany, in the member states of the European Economic Community (EEC) and in the other contract states of the agreement about the European Economic Area.

Die folgenden Medizinprodukte in der Bundesrepublik Deutschland, in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft (EG) und in den Vertragsstaaten der EG in den Verkehr gebracht werden dürfen.

#	Nomenclature term Nomenklaturbezeichnung	Catalog No. Katalog-Nr.	Name of device Produktbezeichnung	DMIDS Registration number Registriernummer
51.	HUMAN PLACENTAL LACTOGEN HPL	K246	Placental lactogen EIA	DE/CA64/00115897
52.	C-REACTIVE PROTEIN	K250	CRP EIA	DE/CA64/00115898
53.	C-PEPTIDE	K267C	C-peptide EIA	DE/CA64/00115900
54.	INSULIN	K267N	Insulin EIA	DE/CA64/00115901
55.	SEX HORMONE BINDING GLOBULIN	K268	SHBG EIA	DE/CA64/00115902
56.	TROPONIN (T + I)	K291	Troponin I EIA	DE/CA64/00115903
57.	LYME ANTIBODY IGG	K118G	Borelia burgdorferi IgG EIA	DE/CA64/00115904
58.	LYME ANTIBODY IGM	K118M	Borelia burgdorferi IgM EIA	DE/CA64/00115905
59.	EBV ANTIBODIES	K108V K108VM K108N	Epstein-Barr virus VCA IgG EIA Epstein-Barr virus VCA IgM EIA Epstein-Barr virus EBNA IgG EIA	DE/CA64/00115906

The above-mentioned medical products are marked with the CE symbol.  
Die oben genannten medizinischen Produkte sind mit dem CE-Zeichen gekennzeichnet.

Represented in the EC by:

Polmed.de Beata Rozwadowska  
Fichtenstr. 12A, 90763 Fürth, Germany  
email: [info@polmed.de](mailto:info@polmed.de)  
Tel: +49 911 93163967

**SRN: DE-AR-000006947**Date: **March 07, 2023**

Polmed.de



**Instruction for use**  
**A solid-phase enzyme immunoassay kit**  
**for the quantitative determination of**  
**carbohydrate antigen 72-4**  
**in human serum or plasma**

## CA 72-4 EIA

Catalogue number **REF K244**



For 96 determinations

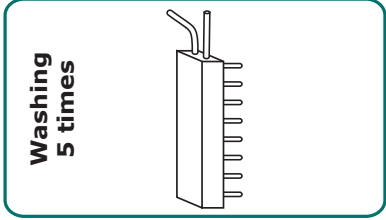
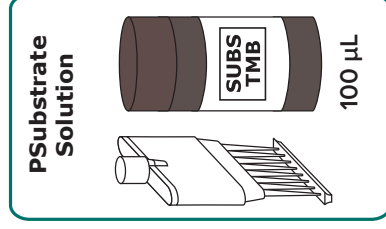
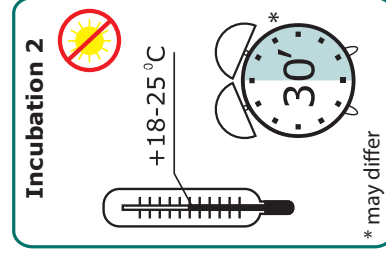
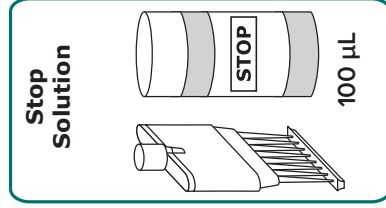
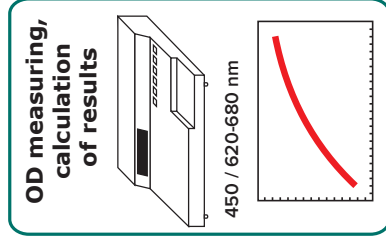
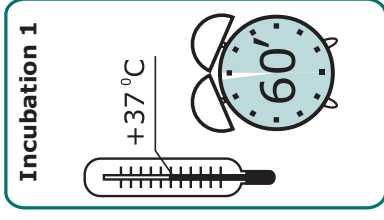
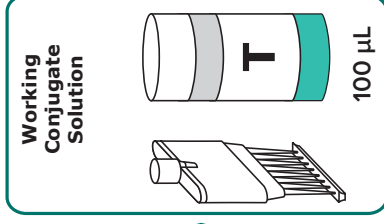
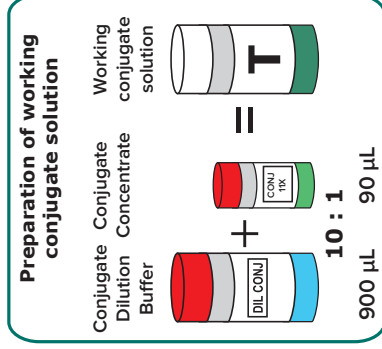
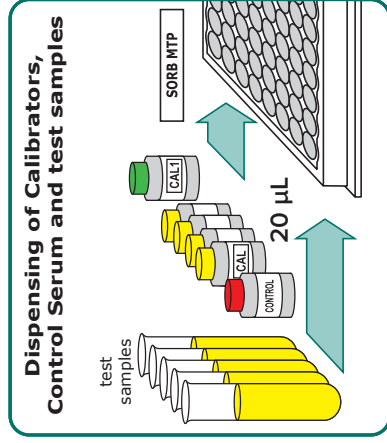


*In vitro* diagnostic medical device



XEMA LLC  
Akademika Yefremova St. 23  
03179, Kyiv, Ukraine  
tel.:+38 044 422-62-16  
tel.:+38 044 294-69-78  
E-mail: qa@xema.com.ua  
www.xema.com.ua

## ASSAY PROCEDURE



During performing several independent series of tests, Calibrators, and Control Serum should be used each time.



**CONTENT**

1. INTENDED USE	2
2. GENERAL INFORMATION	2
3. TEST PRINCIPLE	2
4. KIT COMPONENTS	3
5. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED	4
6. WARNING AND PRECAUTIONS	4
7. SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE OF SAMPLES	5
8. TRANSPORTATION AND STORAGE TERMS OF KIT, WASTE DISPOSAL	5
9. REAGENTS PREPARATION	6
10. ASSAY PROCEDURE	6
11. TEST VALIDITY	7
12. EXPECTED VALUES	8
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
14. REFERENCES	9
SAMPLES IDENTIFICATION PLAN	10

**Instruction for use**  
**A solid-phase enzyme immunoassay kit**  
**for the quantitative determination of**  
**carbohydrate antigen 72-4**  
**in human serum or plasma**  
**CA 72-4 EIA**

**1. INTENDED USE**

The CA 72-4 EIA kit is an enzyme immunoassay, intended for the quantitative determination of carbohydrate antigen 72-4 in human serum or plasma.

Determination of CA 72-4 antigen concentration in serum (plasma) is used as an auxiliary method of early diagnosis, monitoring the effectiveness of therapy in malignant tumors of glandular tissue, such as gastric carcinoma, colon or ovarian cancer, for all population groups.

The field of application is clinical laboratory diagnostics.

**2. GENERAL INFORMATION**

CA 72-4, or a carbohydrate antigen 72-4, is a high MM (230-1000 kD) antigen (epitope) associated to gastric and ovarian cancer as well as some other malignancies and not expressed in noticeable quantities in tissues of healthy adult individuals.

Quantitative determination of CA 72-4 in serum or plasma is helpful (particularly, in combination with CA 19-9 – see XEMA LLC, Cat.# K223) for monitoring of gastric cancer and its therapy, while combined determination of CA 72-4 and CA 125 (see XEMA LLC, Cat.# K222) is used for monitoring of ovarian cancer.

Elevated levels of CA 72-4 are often seen in adenocarcinomas of the gastro-intestinal tract, ovaries (mucinous type) and lungs. Besides, raised CA 72-4 is sometimes also seen in patients with benign pathology (chronic inflammation, cysts, fibrosis). That is why, results of CA 72-4 determination should always be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data.

Functional purpose. Determination of the concentration of CA 72-4 antigen in serum (plasma) is used as an auxiliary method for early diagnosis, monitoring the effectiveness of therapy for malignant glandular tumours, such as gastric carcinoma, colon or ovarian cancer, for all population groups.

**3. TEST PRINCIPLE**

The determination of carbohydrate antigen 72-4 is based on the two-site sandwich enzyme immunoassay principle. On the inner surface of the microplate wells are immobilized specific murine monoclonal antibodies to human CA 72-4. Second antibodies – murine monoclonal antibodies to human CA 72-4 conjugated to the horseradish peroxidase is used as enzyme conjugate. The analysis procedure includes two stages of incubation:

- during the first stage CA 72-4 from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface, as well as horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibodies bind to free epitopes of immobilized CA 72-4;

- during the second stage, the complexes formed due to the reaction with the chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine are visualized.

After stopping the reaction with a stop solution, the intensity of the color of the microwells is measured. The optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured CA 72-4 in the serum specimen (plasma). The concentration is determined according to the calibration graph of the dependence of the optical density on the content of CA 72-4 in the calibration samples.

## 4. KIT COMPONENTS

Code of component	Symbol	Name	Volume	Qty, pcs.	Description
P244Z	SORB MTP	<b>Microplate</b>	-	1	96-well polystyrene strip microplate coated with murine monoclonal antibodies to human CA 72-4, ready to use
C244Z	CAL 1	<b>Calibrator C1</b>	0.5 mL	1	Solution based on human serum, free of CA 72-4, with preservative, ready to use (yellow liquid)
C244Z	CAL 2-5	<b>Calibrators</b>	0.5 mL	4	Solutions based on human serum, containing 5; 15; 50 and 200 U/mL of CA 72-4, with preservative, ready to use (blue liquids)
Q244Z	CONTROL	<b>Control Serum</b>	0.5 mL	1	Solution based on human serum, containing of known CA 72-4 content, with preservative, ready to use (yellow liquid)
T244XZ	CONJ 11X	<b>Conjugate Concentrate</b>	1.2 mL	1	Solution of murine monoclonal antibodies to human CA 72-4 conjugated to the horseradish peroxidase, 11x concentrate (green liquid)
ST244Z	DIL CONJ	<b>Conjugate Dilution Buffer</b>	12 mL	1	Buffer solution with detergent, ready to use (blue liquid)
R055Z	SUBS TMB	<b>Substrate Solution</b>	12 mL	1	Tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution, ready to use (colourless liquid)
S008Z	BUF WASH 26X	<b>26x Concentrate Washing Solution</b>	22 mL	1	Buffer solution with detergent, 26x concentrate (colourless liquid)
R050Z	STOP	<b>Stop Solution</b>	12 mL	1	5.0% solution of sulphuric acid, ready to use (colourless liquid)
The kit also includes instruction for use, quality control data sheet and plate sealing tape (1 pcs.)					

## 5. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- microplate photometer with 450\620-680 nm wavelength;
- dry thermostat for 37°C±1°C;
- automatic plate washer (optional);
- micropipettes with variable volume, range volume 5-1000 µL;
- graduated cylinder of 1000 mL capacity;
- distilled or deionized water;
- timer;
- vortex mixer;
- disposable gloves;
- absorbent paper.

## 6. WARNING AND PRECAUTIONS

*In order to prevent incorrect results, strictly follow the recommended order and duration of the analysis procedure.*

6.1. The kit is for *in vitro* diagnostic use only. For professional laboratory use.

6.2. Follow the rules mentioned below during the kit using:

- do not use kit beyond expire date;
- do not use the kit if its packaging is damaged;
- in order to avoid contamination, use new tips to pipette samples and reagents;
- use only verified equipment;
- close each vial with its own cap, after using the reagent;
- do not use components of other kits or reagents of other manufacturers;
- do not let wells dry after completing the rinsing step; immediately proceed to the next stage;
- avoid bubbles when adding reagents.

**ATTENTION! The TMB substrate solution is light sensitive. Avoid prolonged exposure of the component to light.**

6.3. Some kit components, such as stop solution, substrate solution, and washing solution, may cause toxic or irritant effects. If they get on the skin or mucosa, the affected area should be washed with plenty of running water.

6.4. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

6.5. The Calibrators and Control Serum included in the kit are negative for antibodies to HIV 1,2, hepatitis C virus and HBsAg, but the reagents should be considered as potentially infectious material and handled carefully.

6.6. Specimens must not contain any azide compounds, as they inhibit activity of peroxidase.

6.7. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection.

6.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

6.9. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA LLC.

6.10. Serious incidents related to the kit must be reported to the manufacturer, Authorized Representative, and to the Competent Authority of the EU member state(s) where the incident has occurred.

## 7. SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE OF SAMPLES

7.1. Blood sampling should be carried out from the cubital vein with a disposable needle using a vacuum blood sampling system. Serum or plasma specimens should be clearly labeled and identified. Serum must be separated from the clot as early as possible to avoid hemolysis of red blood cells. If there are any visible particles in the sample, they should be removed by centrifugation at 3000-5000 rpm for 20 minutes at room temperature or by filtration.

Don't use samples with high lipidemia, hemolysis as they may give false test results.

7.2. Specimen should be stored at +2...+8°C up to 3 days. Specimen held for a longer time, should be placed in a freezer at -15°C or below; do not refreeze/thaw samples.

7.3. For the transportation of samples, it is recommended to use triple packaging. The primary package is the labeled tube containing the sample. Secondary packaging is a polyethylene bag that is hermetically closed with a zip-lock. The outer packaging is a heat-insulating container, while the secondary packaging is placed in the outer packaging for transportation in the center of the thermal container. Frozen refrigerants are placed on the bottom, along the side walls of the thermal container, and cover the samples with them.

## 8. TRANSPORTATION AND STORAGE TERMS OF KIT, WASTE DISPOSAL

Information about the singularity storage conditions, transportation of the kit, and disposal of waste should be taken into account by all persons who participate in these processes.

### 8.1. Transportation

The CA 72-4 EIA kit should be transported in the manufacturer's packaging at +2...+8°C. Single transportation at the temperature up to 25°C for 5 days is acceptable.

### 8.2. Storage

The CA 72-4 EIA kit should be stored in the manufacturer's packaging at +2...+8°C. Do not freeze.

The kit contains reagents sufficient for 96 determinations including Calibrators and Control Serum.

Once opened test-kit is stable for 2 months when stored properly as intended by manufacturer at 2-8°C.

In case of partial use of the kit, the components should be stored in the following way:

- the remaining strips should be immediately resealed in the bag along with the silica gel, closed with the zip-lock, and stored at +2...+8°C within 2 months;
- Substrate Solution, Stop Solution, and Washing Solution concentrate after opening the vial, can be stored tightly closed at +2...+8°C until the kit's shelf life;
- Conjugate Concentrate, Conjugate Dilution Buffer, Calibrators and Control Serum after opening the vial, can be stored tightly closed at +2...+8°C within 2 months;
- diluted Washing Solution can be stored at room temperature (+18...+25°C) for up to 5 days or at +2...+8°C for up to 14 days.

Kits that were stored in violation of the storage condition cannot be used.

### 8.3. Disposal

Expired kit components, used reagents and materials, as well as residual samples should be inactivated and disposed of in accordance with legal requirements.

## 9. REAGENTS PREPARATION

9.1. All reagents (including microstrips) and test samples should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) for at least 30 minutes before use.

### 9.2. Microplate preparation

Open the package with the microplate and install the required number of strips into the frame. The remaining strips should be immediately resealed in the bag along with the silica gel and closed with the zip-lock to prevent moisture from affecting the plate's strips.

### 9.3. Washing Solution preparation

Add the contents of the 22 mL Washing Solution concentrate vial to 550 mL of distilled or deionized water and mix thoroughly. In case of partial use of the kit, take the necessary amount of Washing Solution concentrate and dilute it 26 times with distilled or deionized water.

### 9.4. Working conjugate solution preparation

Prepare in a different container a working conjugate solution by 11 dilutions of Conjugate Concentrate in Conjugate Dilution Buffer (eg, 90 µL of concentrate + 900 µL of Conjugate Dilution Buffer). In the case of partial use of the kit, take the necessary amount of Conjugate Concentrate and dilute it 11 times with Conjugate Dilution Buffer, since the working conjugate solution in a diluted form is not stored for a long time.

The spending of the components in case of partial use of the kit is given in the table:

Quantity of strips	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volume of the Washing Solution concentrate, mL	1.8	3.6	5.4	7.2	9	10.8	12.6	14.4	16.2	18	19.8	22
Volume of water, mL	45	90	135	180	225	270	315	360	405	450	495	550
Volume of Conjugate Concentrate, mL	0.09	0.18	0.27	0.36	0.45	0.54	0.63	0.72	0.81	0.9	0.99	1.08
Volume of Conjugate Dilution Buffer, mL	0.9	1.8	2.7	3.6	4.5	5.4	6.3	7.2	8.1	9	9.9	10.8

## 10. ASSAY PROCEDURE

- 10.1. Put the desired number of strips into the frame based on the number of test samples in 2 replicates and 12 wells for Calibrators and Control Serum (2 wells for each Calibrator (CAL 1-5) and 2 wells for Control Serum (Q)).
- 10.2. Dispense **20 µL of Calibrators and Control Serum as well as 20 µL of test serum/plasma samples (SAMP)** to the wells of the microplate according to the scheme below. The introduction of Calibrators, Control Serum and test samples should be carried out within 5 minutes to ensure equal incubation time for the first and last samples.

**NOTE: during performing several independent series of tests, Calibrators, and Control Serum should be used each time.**

**Scheme of introduction of samples**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL1	SAMP3	SAMP3	SAMP11	SAMP11						
B	CAL2	CAL2	SAMP4	SAMP4	SAMP12	SAMP12						
C	CAL3	CAL3	SAMP5	SAMP5								
D	CAL4	CAL4	SAMP6	SAMP6								
E	CAL5	CAL5	SAMP7	SAMP7								
F	Q	Q	SAMP8	SAMP8								
G	SAMP1	SAMP1	SAMP9	SAMP9								
H	SAMP2	SAMP2	SAMP10	SAMP10								

- 10.3. Dispense **100 µL of Working conjugate solution** to all wells (see 9.4).
- 10.4. Carefully mix the contents of the microplate in a circular motion on a horizontal surface, cover strips with a plate sealing tape and incubate for **60 minutes at +37°C**.
- 10.5. At the end of the incubation period, remove and discard the plate cover. Aspirate and wash each well **5 times** using an automatic washer or an 8-channel dispenser. For each washing, add 300 µL of Washing Solution (see 9.3) to all wells, then remove the liquid by aspiration or decantation. The residual volume of the Washing Solution after each aspiration or decantation should be no more than 5µL. After washing, carefully remove the remaining liquid from the wells on the absorbent paper. For the automatic washer/analyzer, the Washing Solution volume can be increased to 350 µL.
- 10.6. Add **100 µL of Substrate Solution** to all wells. The introduction of the Substrate Solution into the wells must be carried out within 2-3 minutes. Incubate the microplate in the dark **at room temperature (+18...+25°C) for 30 minutes**.  
*The incubation time can be varied depending on the intensity of the blue colour development.*
- 10.7. Add **100 µL of Stop Solution** to all wells in the same order as the Substrate Solution. After adding the Stop Solution, the contents of the wells turn yellow.
- 10.8. Read the optical density (OD) of the wells at 450 nm and reference light filters 620–680 nm using a microplate photometer within 5 minutes of adding the stop solution. Set photometer blank on CAL1.
- 10.9. Plot a calibration curve in linear coordinates: (x) is the concentration of CA 72-4 in the Calibrators U/mL, (y) – OD versus concentration of CA 72-4 (OD 450 nm / 620–680 nm). Manual or computerized data reduction is applicable at this stage. For the algorithm calculation (approximation) of the calibration curve, using the interval (segment-linear, point-to-point) method is recommended.
- 10.10. Determine the corresponding concentration of CA 72-4 in tested samples from the calibration curve.

**11. TEST VALIDITY**

The test run shall be considered valid if the OD of CAL1 is above 0.15, and the values of the Control Serum fall into the required range (see Quality control Data Sheet).

## 12. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for CA 74-2. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered antimouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

NOTE: values of CA 74-2 concentrations in the tested samples that are below the LoD (0.3 U/mL) and also exceed the value of the upper calibrator (200 U/mL) should be provided in the following form : «the CA 74-2 concentration of tested sample X is «lower than 0.3 U/mL» or «higher than 200 U/mL».

Sex, age	Units, U/mL	
	Lower limit	Upper limit
Healthy donors	-	6.0

## 13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 13.1. Analytical performance characteristics

#### 13.1.1. Precision of Measurement

*Reproducibility.* The coefficient of variation of determining the content of CA 72-4 in the same sample of blood serum (plasma) using the kit CA 72-4 EIA does not exceed 10%.

#### 13.1.2. Trueness

The trueness of measurement is the degree of closeness of the average value obtained from a large number of measurement results to the true value. The bias of the measurement result (bias of measurements) is the difference between the mathematical expectation of the measurement result and the true value of the measurand. The bias was calculated for each sample and it was determined whether it corresponds to the specified limits of  $\pm 10\%$ .

#### 13.1.3. Linearity

Linearity was determined using sera samples with known CA 72-4 concentration (low and high) and mixing them with each other and buffer solution in different proportions. According to the measurements, linear range of kit is 5–200 U/mL  $\pm 10\%$ .

#### 13.1.4. Analytical sensitivity

Limit of detection (LoD) – the lowest CA 72-4 concentration in the serum or plasma sample that is detected by the CA 72-4 EIA kit is no lower than 0.3 U/mL.

Limit of quantification (LoQ) – the lowest concentration of the analyte in the sample that is determined quantitatively with the declared trueness for CA 72-4 EIA kit is 5 U/mL.

#### 13.1.5. Hook Effect

Hook effect is absent for all samples up to reasonably foreseen concentrations 20000 U/mL.

#### 13.1.6. Analytical specificity

For the analysis result is not affected by the presence in the sample of bilirubin in a concentration of up to 0.21 mg/mL and hemoglobin in a concentration of up to 10 mg/mL.

The cross-reactivity of CA 74-2 with other analytes is shown in the table:

Analyte	Cross-reactivity, %
CEA	<0.1
CA 125	<0.1
CA 19-9	<0.1



#### 14. REFERENCES

1. DJ Byrne, MC Browning, and A Cuschieri – CA72-4: a new tumour marker for gastric cancer. *Br J Surg*, Sep 1990; 77(9): 1010-3.
2. Ian J. Jacobs and Usha Menon – Progress and Challenges in Screening for Early Detection of Ovarian Cancer. *Mol. Cell. Proteomics*, Apr 2004; 3: 355 – 366.
3. R Hamazoe, M Maeta, T Matsui, S Shibata, S Shiota, and N Kaibara – CA72-4 compared with carcinoembryonic antigen as a tumour marker for gastric cancer. *Eur J Cancer*, Jan 1992; 28A(8-9): 1351-4
4. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
5. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*».
6. НПАОП 85.14-1.09-81. Правила облаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарноепідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров`я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81).

**SAMPLES IDENTIFICATION PLAN**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>												
<b>B</b>												
<b>C</b>												
<b>D</b>												
<b>E</b>												
<b>F</b>												
<b>G</b>												
<b>H</b>												

LOT \_\_\_\_\_

DATE \_\_\_\_\_











**SAMPLES IDENTIFICATION PLAN**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>												
<b>B</b>												
<b>C</b>												
<b>D</b>												
<b>E</b>												
<b>F</b>												
<b>G</b>												
<b>H</b>												

LOT \_\_\_\_\_

DATE \_\_\_\_\_



	Manufacturer
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Catalogue number
 YYYY-MM	Use-by date
	Batch code
	Temperature limit
	Contains sufficient for <n> tests
	Caution
	Consult instructions for use
	Conformity Marking with technical regulations in Ukraine

**For any issues related to operation of the kit and technical support,  
please contact by telefon number**

**+38 044 294-69-78**

**or write to:**

**[qa@xema.com.ua](mailto:qa@xema.com.ua)**



XEMA LLC  
Akademika Yefremova St. 23  
03179, Kyiv, Ukraine  
tel.:+38 044 422-62-16  
tel.:+38 044 294-69-78  
E-mail: [qa@xema.com.ua](mailto:qa@xema.com.ua)  
[www.xema.com.ua](http://www.xema.com.ua)