



EKVITESTLAB LLC

Velyka Vasylkivska St. 114
03150 Kyiv, Ukraine
Tel. 0-800-31-89-87
e-mail: info@equitest.com.ua
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 2025

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 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 or by tel.: +38-050- 818-7-333



Declaration of Conformity

According to annex III of the Council Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical device
We,

EKVITESTLAB LLC

Velyka Vasylkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150, tel. 0(800)31-89-87; +38 (044)334-89-87
e-mail: info@equitest.com.ua, web-site: www.equitest.com.ua

Declare under our sole responsibility that the following in vitro diagnostic medical devices
other than those covered by annex II and devices for performance evaluation

**EQUI HAV IgM - ELISA kit for the qualitative detection of IgM antibodies to
hepatitis A virus, REF EI-031**

Meet the provisions of the Council Directive 98/79/EC concerning medical devices which
apply to them.

Undersigned declares to fulfill the obligations imposed by Annex III section 2 to 5:

- availability of the technical documentation set in Annex III (section 3), allowing the assessment of conformity of the product with the requirements of the Directive.
- the manufacturer shall take necessary measures to ensure that the manufacturing process follows the principles of quality assurance as appropriate for the products manufactured (Annex III section 4).
- the manufacturer shall institute and keep up to date a systematic procedure to review experience gained from devices in the post-production phase and to implement appropriate means to apply any necessary corrective actions (Annex III section 5).

Conformity assessment was performed according to Article 9 (7) and Annex III, section 3.

Our current Quality System is formatted to international standards:

- **ISO 13485:2016 «Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes»**

Corporate Contact Information

EKVITESTLAB LLC

Velyka Vasytkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

tel. 0(800)31-89-87; +38 (044)334-89-87

e-mail: info@equitest.com.ua

RESPONSIBLE PERSON'S name: Anna Yurchuk

Position: Director

SIGNATURE :



Date : October 25, 2021

Stamp



European Authorized Representative:

Registered Address:

Obelis s.a.

Bd. Général Wahis 53

B-1030 Brussels, Belgium

Phone: 32.2.732.59.54

Fax: 32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net

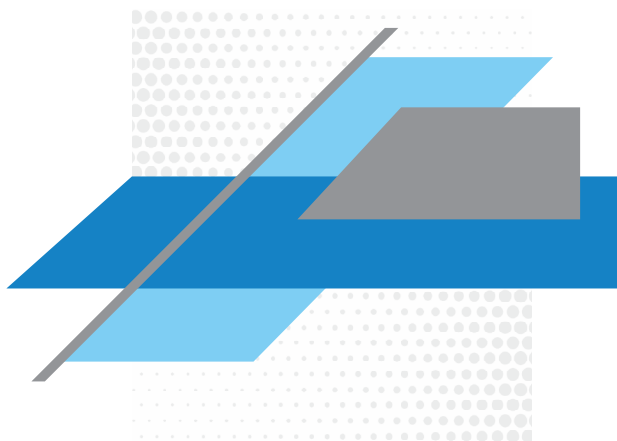
Representative: Mr. Gideon ELKAYAM (CEO)



HAV IgM

**ELISA kit for the qualitative detection of IgM
antibodies to hepatitis A virus**

Instruction for use



IVD

REF
EI-031

Σ 96
tests

CE

EQUI HAV IgM

ELISA kit for the qualitative detection
of IgM antibodies to hepatitis A virus

1. INTENDED USE

The «EQUI HAV IgM» is ELISA kit intended for the qualitative detection of IgM antibodies to hepatitis A virus in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to diagnose acute hepatitis A. The testing procedure is designed for both manual arrangement with automatic pipettes and standard equipment, and for automated «open» immunoassay analysers.

Target group: blood or organ donors; pregnant women and children born to infected mothers; patients with symptoms of liver disease.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories, blood transfusion stations, as well as in other institutions working in the field of *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

One of the most common foodborne infections is hepatitis A. The hepatitis A virus (HAV) causes acute liver disease, which can be mild or severe. Unlike hepatitis B and C, this hepatitis does not become chronic, but can lead to acute liver failure, which is characterized by high mortality.

Hepatitis A virus is a small shellless RNA virus from the *Picornaviridae* family. It is characterized by being highly stable in different environments and can be stored at + 4 ° C for several months, but becomes inactive after 5 minutes at 100 ° C. The virus replicates in liver cells, and then is released through the bile into the environment with the fecal masses of the infected person. The cellular immune response to HAV infection leads to the destruction of hepatocytes, liver dysfunction and the development of symptoms, typical for other types of hepatitis.

Acute hepatitis A, even with the clinical manifestations, does not differ from other viral hepatitis. Therefore, serological markers of infection are used for diagnosis, namely the detection of specific antibodies to HAV antigens. IgM antibodies are detected in the serum 1-2 weeks after infection, with the onset of symptoms or a few days before. In the maximum titer of anti-CAA IgM are detected in the jaundice period, after that their level gradually decreases. In most patients, specific IgM ceases to be detected after 6 months, and may occasionally circulate in the blood for more than a year. IgG antibodies to HAV antigens begin to be released shortly after IgM antibodies and stay in the blood throughout life. Also, specific IgG is produced after a vaccination. Detection of IgG antibodies to CAA indicates the formation of a stable immunity due to infection or immunization.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

Detection of specific IgM antibodies to hepatitis A virus in the «EQUI HAV IgM» ELISA kit is based on the principle of «IgM capture» of solid-phase ELISA in a two-stage incubation. Monoclonal antibodies specific for human IgM immunoglobulins are adsorbed into the wells of the plate. During the first step of incubation of the

test samples in the wells of the ELISA plate, IgM immunoglobulins, if present in the samples, bind to monoclonal antibodies in the solid phase. The wells are washed to remove unbound components, leaving only specific antibody-antibody complexes. A mixture of HAV antigen and peroxidase conjugate of HAV-specific antibodies that bind to solid-phase immune complexes is then added. Unbound components are removed during washing. Immune complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After a 30-minute incubation, the reaction is halted by adding a stop solution. Optical density (OG) in the wells is determined on a spectrophotometer at a wavelength of 450 / 620-695 nm. The intensity of the yellow color is proportional to the number of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

<div>STRIPS</div>	1 x 96 wells	Microplate Each plate well is coated with monoclonal antibodies specific for human IgM immunoglobulins. The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2-8 °C for a maximum of 6 months
<div>CONTROL +</div>	1 x 0,25 ml	Positive control The solution of human IgM immunoglobulins crosslinked with monoclonal antibodies specific for horseradish peroxidase, with a preservative (pink). Store at 2-8 °C
<div>CONTROL -</div>	1 x 0,6 ml	Negative control Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
<div>DIL SAMPLE</div>	1 x 13 ml	Serum dilution solution Buffer solution with monoclonal antibodies to human IgG, milk extract, detergent and preservative (brown). Store at 2-8 °C
<div>CONJ 11x</div>	1 x 1,3 ml	Conjugate (11x concentrated) 11-fold concentrate of conjugate of antibodies to hepatitis A virus with horseradish peroxidase in buffer solution with stabilizers (purple). Dilute the conjugate (11x) 1:11 with the conjugate dilution solution before use (eg 100 µl concentrate + 1 ml conjugate dilution solution, enough for 8 wells). Diluted solution should be stored at 2-8 °C for no more than 1 day
<div>DIL CONJ</div>	1 x 13 ml	Conjugate dilution solution Buffer solution of inactivated hepatitis A virus antigen with detergent and preservative (yellow). Store at 2-8 °C
<div>SOLN TMB</div>	1 x 13 ml	TMB solution (ready to use) TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C

TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	Washing solution TWEEN (20x concentrated) 20-fold phosphate buffer concentrate with Tween-20 (colourless). Dilute TWEEN detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days
SOLN STOP	1 x 13 ml	Stop Solution (ready to use) 0.5 mol H ₂ SO ₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620–695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use for analysis or mix components of different batches, components of kits for different nosologies, or reagents from other manufacturers with the «EQUI HAV IgM» ELISA kit;
- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;
- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA kit;
- **SOLN|TMB** solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of **SOLN|TMB** with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for conjugate solution and **SOLN|TMB**;
- do not evaluate the test results visually (without a reader);
- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls from the «EQUI HAV IgM» ELISA kit have been tested and found to be for anti-HIV1/2, anti-HCV and anti-*Treponema pallidum* antibodies and HBsAg negative; however, controls and test samples should be handled as potentially hazardous infectious materials;
- some of the kit components contain low concentrations of harmful substances and can damage skin or mucosa. In case of contact of [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and conjugate solution with mucous membranes or skin, immediately wash the affected area with plenty of water;
- in case of spillage of acid-free solutions, e. g. sera, treat the surface with a disinfectant solution and then wipe dry with filter paper. Otherwise first neutralize acid with sodium bicarbonate solution and then wipe the surface dry as described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- the liquid waste must be inactivated, for example, with hydrogen peroxide solution at the final concentration of 6% for 3 hours at room temperature, or with sodium hypochlorite at the final concentration of 5% for 30 minutes, or with other approved disinfectants;
- the solid waste must be inactivated by autoclaving at a temperature not less than 132°C;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, the stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by

centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

NOTE! It is very important to keep all ELISA kit components for at least 30 min at room temperature 18-25 °C before the assay!

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TWEEN|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

8.3. Conjugate solution preparation

Working dilution of the conjugate is prepared as follows: dilute **CONJ|11x** (purple) in a clean vial of solution **DIL|CONJ** (yellow) in the ratio 1:11 (ie, 1 + 10), the solution turns green. For example, for 8 well analysis add to 1 ml **DIL|CONJ** 100 µl **CONJ|11x**. The solution of the conjugate in the working dilution is stable during the day when stored at 2-8 °C.

9. ASSAY PROCEDURE

9.1. Prepare the necessary number of wells (four wells for controls and a necessary number of wells for test samples) and insert them into the ELISA plate frame.

Be sure to add control wells in every test run.

9.2. Fill in the sample application plan.

9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.

9.4. Add 90 µL of **DIL|SAMPLE** into each plate well.

9.5. Add 10 µL of controls and test samples into the wells:

CONTROL|+ – into well A1,

CONTROL|- – into wells B1, C1 and D1,

and test samples into the remaining wells.

At the time of adding, the solution changes its colour from brown to blue.

Pipette the mix in the wells carefully to avoid foaming.

9.6. Cover the strips up with adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.

- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
- aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
 - add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
 - aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
 - repeat the washing step 4 more times;
 - after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.8. Prepare conjugate solution as per para. 8.3.
- 9.9. Add 100 µL of conjugate solution into each well. Cover the strips with a new piece of adhesive film and incubate for **60 minutes at 37 °C**.
- 9.10. Following incubation, remove the film carefully and wash the wells five times as described in para. 9.7.
- 9.11. Add 100 µL of **SOLN|TMB** into the wells; do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.12. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at a room temperature of 18-25 °C. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.13. Add 100 µL of **SOLN|STOP** into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding **SOLN|TMB**. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.14. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

*Measurement at the single wavelength of 450 nm is possible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only **SOLN|TMB** and **SOLN|STOP** must be added in blank well).*

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD of the negative control (\overline{Nc}), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

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

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO, \text{ where } OD_{sample} \text{ is the OD sample.}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

CONTROL +

$$OD \geq 1,2$$

CONTROL -

$$OD \leq 0,150$$

CONTROL -

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

where Ncn is the OD for each
Nc run

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and \bar{Nc} is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

$$IP_{\text{sample}} > 1,1$$

POSITIVE

$$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$$

BORDERLINE*

$$IP_{\text{sample}} < 0,9$$

NEGATIVE

* Uncertain samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated in 32 replicates on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
37s/2	1,576	4,85	5,3
24s	2,462	7,57	4,3

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated for 4 days in 4 sets of analysis, 8 replicates in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
37s/2	1,600	4,78	6,3
24s	2,463	7,36	7,1

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 $\mu\text{mol/L}$), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

The diagnostic characteristics of the ELISA kit were evaluated by examining a set of 30 samples containing IgM antibodies to hepatitis A virus, a set of donor serum samples (188 samples) and samples of PHT202 Anti-Hepatitis A Virus (HAVed) panel. Performance Panel (contains 8 positive and 13 negative samples) - a total of 239 samples - was compared to similar commercial kits. For this set (239 samples) the relative sensitivity of the «EQUI HAV IgM» ELISA kit is 100%, the relative specificity - 100%, the percentage of coincidence - 100%.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

A positive result in the «EQUI HAV IgM» ELISA kit is the evidence that the patient has IgM antibodies specific for hepatitis A virus. Anti-CAA specific IgM antibodies are usually markers of active replication of hepatitis A virus.

In order to counteract the false-positive results caused by the presence of autoantibodies specific for class G immunoglobulins (rheumatoid factor) in human serum samples, the kit uses a special block component that prevents the formation of immune complexes with anti-human antibodies in the solid phase.

The final diagnosis cannot be established solely on the basis of serological test results. When making a diagnosis the results of a set of laboratory and instrumental studies, as well as clinical manifestations of the disease should all be taken into account.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
<i>High background in all wells</i>	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use
Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
<i>High background in a row of wells</i>	
Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer

<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. CDC. Hepatitis A - General Information // <https://www.cdc.gov/hepatitis/hav/pdfs/hepageneralfact-sheet.pdf>.
2. Cuthbert J.A. Hepatitis A: Old and New // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2001. - Vol.14, No.1. - P. 38–58.
3. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Factsheet about hepatitis A // <https://ecdc.europa.eu/en/hepatitis-A/facts>.
4. Franco E., Meleleo C. et al. Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries // *World Journal of Hepatology*. - 2012. - Vol. 4(3). - P. 68–73.
5. Koff R.S. Hepatitis A // *Lancet*. - 1998. - Vol 351. - P. 1643–1649.
6. Lima L.R., De Almeida A.J. et al. Evidence of Hepatitis A Virus Person-to-Person Transmission in Household Outbreaks // *PLoS One*. - 2014. - Vol. 9(7). - P. e102925.
7. Wang C.H., Tschen S.Y. et al. Immune response to hepatitis A virus capsid proteins after infection // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1996. - Vol. 34, No. 3. - P. 707–713.
8. WHO Fact sheets. Hepatitis A // <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-a>.
9. Wu D., Guo C-Y. Epidemiology and prevention of hepatitis A in travelers // *Journal of Travel Medicine*. - 2013. - Vol.20(6). - P. 394–399.
10. 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.
11. Закон України «Про відходи» // Відомості Верховної Ради України. - 1998. - №36-37.
12. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
13. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
14. 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
15. 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.



Manufacturer



Authorized Representative in the European Community



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Non-Sterile



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Keep dry



Compliance with EU safety requirements

Edition 6, 01.11.2021

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:



Obelis s.a.
Bd Général Wahis 53
1030 Brussels
Belgium
Tel: +(32)2 732-59-54
Fax: +(32)2 732-60-03
mail@obelis.net



Ekvittestlab LLC
Velyka Vasylykivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150
Tel: 0(800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,
e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua

ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Dispense 90 µl [DIL][SAMPLE] into the wells
(brown)

Add to 10 µl of controls and samples into the wells:
A1 – [CONTROL+], B1, C1, D1 – [CONTROL-],
other wells – examined samples
(change of colour from brown to blue)

Cover strips with an adhesive film, incubate for **30 min at 37°C**

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of prepared 1:11 (1+10) conjugate solution into all wells
(green)

Cover strips with an adhesive film, incubate for **60 min at 37°C**

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][TMB] into all wells

Incubate for **30 min in the dark at 18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN][STOP] into all wells
(change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at
450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

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

$$CO = \bar{Nc} + 0,3;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO$$

\bar{Nc} - the average value of OD 3-x [CONTROL-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE



HBsAg

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

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-011

Σ 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

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">STRIPS</div>	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

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL +</div>	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

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL -</div>	2 x 1,6 ml	Негативная сыворотка крови человека с консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C
--	------------	--

Конъюгат (11х концентрат)

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONJ 11x</div>	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 (11х) 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

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DIL CONJ</div>	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)

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">SOLN TMB</div>	1 x 13 ml	Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C
---	-----------	---

Раствор для промывки TWEEN (20х концентрат)

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">TWEEN WASH 20x</div>	1 x 50 ml	20-кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 (бесцветный). Развести раствор для промывки TWEEN (20х) 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)

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">SOLN STOP</div>	1 x 13 ml	Раствор 0,5 mol H ₂ SO ₄ (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 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 [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 μl [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 μl [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

$OD_{sample} \geq CO$ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ

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

* Первоначально положительные образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках ИФА-набора «EQUI 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_{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 _{ср}	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 _{ср}	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 μ mol/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 (серонегативных 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
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, ознакомиться 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, 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

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

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

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

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

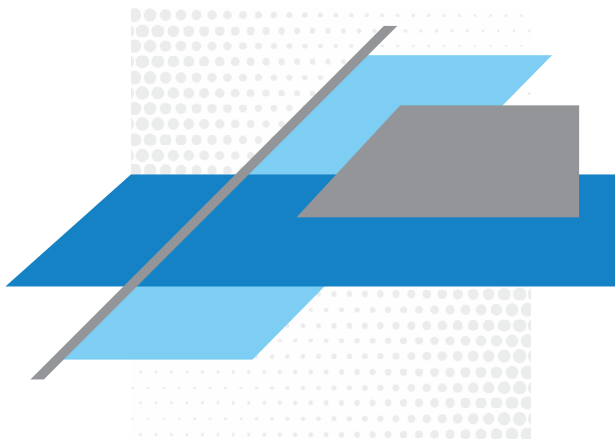
$OD_{sample} \geq CO$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$OD_{sample} < CO$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ



HBcore IgM

**ИФА-набор для качественного обнаружения антител
класса IgM к коровому антигену вируса гепатита В**

Инструкция по применению



IVD

REF
EI-016

Σ 96
анализов


UA.TR.061

EQUI HBcore IgM

ИФА-набор для качественного обнаружения антител класса IgM к коровому антигену вируса гепатита В

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ИФА-набор «EQUI HBcore IgM» предназначен для качественного обнаружения антител класса IgM 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 из 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, 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 *Нерадnaviridae* 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 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 выявляется ДНК вируса и HBeAg, антител к HBeAg нет.

ВОЗ рекомендует диагностировать острый гепатит В при наличии HBsAg и антител IgM к HBcAg, 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

Выявление специфических антител класса IgM к коровому антигену вируса гепатита В в наборе ИФА «EQUI HBcore IgM» базируется на принципе «IgM-захвата» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы моноклональные антитела, специфические к иммуноглобулинам класса IgM человека. При первом этапе инкубации исследуемых образцов в лунках планшета ИФА иммуноглобулины класса IgM, если они присутствуют в образцах, связываются с моноклональными антителами на твердой фазе. Лунки отмываются для удаления несвязанных компонентов, остаются только специфические комплексы антитело-антитело. После этого добавляется пероксидазный конъюгат рекомбинантного антигена HBcore, который связывается с иммунными комплексами на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются при отмывании. Иммунные 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 антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

Планшет ИФА

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

Позитивный контроль

Раствор иммуноглобулинов IgM человека, сшитых с моноклональными антителами, специфичными к пероксидазе хрена, с консервантом (розовый). Хранить при температуре 2-8°C

Негативный контроль

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

Раствор для разведения сывороток

Буферный раствор с экстрактом молока, детергентом и консервантом (фиолетовый). Хранить при температуре 2-8°C

Конъюгат (11х концентрат)

11-кратный концентрат конъюгата рекомбинантного НВсого антигена с пероксидазой хрена в буферном растворе со стабилизаторами (фиолетовый). Развести конъюгат (11х) 1:11 раствором для разведения конъюгата перед использованием (например, 100 µl концентрата + 1 ml раствора для разведения, достаточно для 8 лунок). Разбавленный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 1 суток

Раствор для разведения конъюгата

Буферный раствор с детергентом и консервантом (желтый). Хранить при температуре 2-8°C

Раствор ТМБ (готов к использованию)

Раствор ТМБ, H₂O₂, стабилизатор, консервант (бесцветный). Хранить при температуре 2-8°C

Раствор для промывки TWEEN (20х концентрат)

20-кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 (бесцветный). Развести раствор для промывки TWEEN (20х) 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

STRIPS 1 x 96 лунок

CONTROL + 1 x 0,25 ml

CONTROL - 1 x 0,6 ml

DIL SAMPLE 1 x 21 ml

CONJ 11x 1 x 1,4 ml

DIL CONJ 1 x 14 ml

SOLN TMB 1 x 13 ml

TWEEN WASH 20x 1 x 50 ml

В состав набора 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. Застережения

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 HBcore IgM»;
- 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 HBcore IgM» 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 промывки 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 образцов и контролей

Рабочее разведение образцов и контролей в лунках **STRIPS** составляет 1:20. Его можно приготовить предварительно в отдельных пробирках (190 µl **DIL|SAMPLE** + 10 µl испытуемых образцов или контролей) или непосредственно в лунках **STRIPS** (95 µl **DIL|SAMPLE** + 5 µl испытуемых образцов или контролей).

Осторожно пипетируйте смесь, не допуская пенообразования. Процедуру разведения образцов и контролей проводите непосредственно перед анализом

8.4. Приготовление раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата готовится следующим образом: разведите **CONJ|11x** (фиолетовый) в чистом флаконе раствором **DIL|CONJ** (желтый) в соотношении 1:11 (т.е. 1+10), раствор окрашивается в зеленый цвет. Например, для 8 лунок анализа добавить в 1 ml **DIL|CONJ** 100 µl **CONJ|11x**. Раствор конъюгата в рабочем разведении стабилен в течение суток при хранении 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. Разведите контроли и исследуемые образцы согласно пункту 8.3. Внесите по 100 µl разведенных 1:20 контролей и образцов в лунки стрипов или непосредственно разведите (95+5) в лунках **STRIPS**:

CONTROL|+ – в лунку A1,

CONTROL|- – в лунки B1, C1, D1,

в остальные лунки – исследуемые образцы.

При разведении образцов происходит изменение цвета раствора с фиолетового на синий. Осторожно пипетируйте смесь в лунках, не допуская пенообразования.

9.5. Заклейте стрипы клейкой пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 37°C.

- 9.6. 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.
- 9.7. Приготовьте раствор конъюгата согласно пункту 8.4.
- 9.8. Внесите в лунки по 100 µl раствора конъюгата. Стрипы накройте новой клейкой пленкой 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 9.6.
- 9.10. Внесите в лунки по 100 µl [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 µl [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 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

Вычислите среднее значение ОП негативного контроля (\bar{Nc}), уровень граничного значения (Cut off - CO) и индекс положительности образца (IP_{sample}).

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

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO, \text{ де } OD_{sample} - \text{ОП образца}$$

10.2. Контроль достоверности результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они соответствуют следующим требованиям:

CONTROL +

ОП $\geq 1,2$

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 отвергают и рассчитывают \bar{Nc} по остальным значениям ОП негативного контроля. Если более одного значения ОП негативного контроля не соответствует указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного выполнения.

10.3. Интерпретация результатов

$IP_{sample} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ*
$IP_{sample} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

*Неопределенные образцы рекомендуется исследовать повторно в двух лунках ИФА-набора. Если результаты снова будут в пределах неопределенных, следует провести отбор и анализ нового образца через 7-14 дней. В случае повторного получения неопределенных результатов такие образцы считать негативными.

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 разным уровнем специфических антител оценивали в 32 повторях на одной серии ИФА-наборов.

№ сыворотки	ОП _{ср}	IP _{ср}	CV, %
473	1,253	3,91	5,0
231	1,708	5,33	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 _{ср}	IP _{ср}	CV, %
473	1,255	3,8	5,1
231	1,730	5,24	3,7

Аналитическая специфичность

На результат анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,1 mg/ml (172,3 μ 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 HBcore IgM» использовали 34 образца сывороток от пациентов с диагнозом гепатит В. Кроме того, была использована коммерческая панель охарактеризованных образцов – производства SeraCare Life Sciences Inc. По результатам анализа клиническая чувствительность ИФА-набора «EQUI HBcore IgM» составляет 100%.

Исследование характеристик метода по сравнению с аналогичным коммерческим набором ИФА проводили на целевой группе беременных женщин и выборке доноров (всего 432 образца). Для выборки указанных образцов сывороток крови показатели составляли: относительная специфичность 100%, процент совпадения – 99,5%.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

Интерпретация результатов должна производиться с учетом клинических проявлений и данных комплекса лабораторных исследований. Для диагностики острого, хронического или перенесенного гепатита В, оценки эффективности терапии рекомендуется дополнительно провести исследование образца других маркеров ВГВ, выявление ДНК и оценку биохимических показателей крови пациента.

Положительный результат в ИФА-наборе «EQUI HBcore IgM» является свидетельством наличия у пациента антител класса IgM к коровому антигену вируса гепатита В.

Отрицательный результат в ИФА-наборе «EQUI HBcore IgM» 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, специфических антител класса IgG к антигену HBcore и антител к HBsAg (например, в ИФА-наборах «EQUI HBsAg», «EQUI HBcore IgG» 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 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
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, ознакомиться с сопроводительными документами



Ознакомление с инструкцией по применению



Беречь от прямых солнечных лучей



Знак соответствия техническим регламентам

Редакция 6 от 23.11.2021г.

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, www.equitest.com.ua

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Выдержать реагенты 30 min при температуре 18-25°C

В лунки планшета внести по 100 µl разведенных 1:20 контролей и исследуемых образцов или развести (95+5) в лунках STRIPS A1 – CONTROL+, B1, C1, D1 – CONTROL-, E1 и в остальные лунки - исследуемые образцы (происходит изменение цвета с фиолетового на синий)

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

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

В лунки стрипов внести по 100 µl приготовленный 1:11 (1+10) раствор конъюгата.
(зеленый цвет)

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

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

В лунки стрипов внести по 100 µl SOLN/TMB

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

В лунки стрипов внести по 100 µl
(происходит изменение цвета с голубого на желтый)

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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

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

$$CO = \overline{Nc} + 0,3;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO$$

\overline{Nc} - Среднее значение ОП 3-х CONTROL-

CO - Уровень граничного значения (Cut off)

IP_{sample} - Индекс положительности образца

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$IP_{sample} > 1,1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ
$IP_{sample} < 0,9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ