

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ



РОССИЯ г. Нижний Новгород
Почтовый адрес: 603093 ул. Яблонева, 22, а/я 69
Юридический адрес: 603094 ул. Коминтерна, 47
ИНН 5259000159 КПП 525901001
ОГРН 1025202838627
E-mail: info@npods.nnov.ru
www.npods.ru

Приемная	тел./факс	(831) 434-97-70
Канцелярия	тел./факс	(831) 434-86-83
Бухгалтерия	тел./факс	(831) 434-97-74
Департамент продаж	тел./факс	(831) 467-82-02 467-82-15 467-82-16 467-82-17

REF	В-1154		96
REF	В-1152		192
REF	В-1155		480
REF	В-1156		48 (для подтверждения)

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-НВsAg»

Тест-система иммуноферментная для выявления или подтверждения
поверхностного антигена вируса гепатита В,
набор диагностический

Содержание

I. Назначение.....	3
II. Состав набора «ДС-ИФА-НВsAg».....	3
III. Меры предосторожности.....	5
IV. Инструкции по безопасности.....	5
V. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемые с набором реагентов.....	6
VI. Отбор и подготовка образцов.....	6
VII. Подготовка реагентов.....	7
VIII. Проведение анализа.....	8
IX. Результаты.....	11
X. Процедура выполнения подтверждающего теста.....	11
XI. Результаты подтверждающего теста.....	14
XII. Срок годности. Условия хранения и транспортирования.....	15
XIII. Объяснение символов.....	15
Приложение.....	16

Набор реагентов выпускается в виде четырех комплектов.

Комплекты 1, 2, 3 – для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В:

Комплект 1 рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для одновременной постановки 96 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа, возможна 3-кратная постановка на автоматических анализаторах (разборность 32 x 3);

Комплект 2 рассчитан на проведение 192 (два разборных планшета) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для одновременной постановки 192 (96 x 2) определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа;

Комплект 3 рассчитан на проведение 480 (пять разборных планшетов) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для постановки 480 (96 x 5) определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа;

Комплект 4 – для подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В рассчитан на проведение 48 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по два стрипа) использования набора или для одновременной постановки 48 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-НВsAg» предназначен для выявления или подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке (плазме), лейкоцитарном интерфероне, иммуноглобулинах, альбуминах и других препаратах, приготовленных из сыворотки (плазмы) крови человека методом иммуноферментного анализа. Возможно выявление или подтверждение реакцией нейтрализации, как диких типов, так и мутантных вариантов поверхностного антигена вируса гепатита В.

Чувствительность набора (минимальное количество выявляемого антигена вируса гепатита В) – 0,1 МЕ/мл (термостат); 0,05 МЕ/мл (термостатируемый шейкер).

II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-НВsAg»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска			
	Комплект 1	Комплект 2	Комплект 3	Комплект 4
Иммуносорбент – полистироловый разборный планшет с сорбированными в лунках моноклональными антителами мыши к НВsAg (анти-НВs).	1 планшет	2 планшета	5 планшетов	1 планшет
Конъюгат (концентрат x 11) – анти-НВs, меченные пероксидазой хрена. Прозрачная или опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 4,0 мл	1 флакон 0,75 мл
РРК (раствор для разведения конъюгата) – опалесцирующая голубого цвета жидкость, допустимо образование осадка, растворяющегося при встряхивании.	1 флакон 20,0 мл	1 флакон 20,0 мл	2 флакона по 20,0 мл	1 флакон 8,0 мл
К+1 (контрольный положительный образец) – очищенный НВsAg в сыворотке крови человека, не содержащей антитела к НВsAg, ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированной прогреванием. Прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость.	1 флакон 2,0 мл	1 флакон 4,0 мл	1 флакон 4,0 мл	1 флакон 3,0 мл

К+2 (контрольный слабоположительный образец), лиофилизированный – очищенный HBsAg с концентрацией $0,150 \pm 0,05$ МЕ/мл в сыворотке крови человека, не содержащей антитела к HBsAg, ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инаktivированной прогреванием. Сухая пористая аморфная масса белого или светло-желтого цвета.	1 флакон	2 флакона	5 флаконов	-
К- (контрольный отрицательный образец) – сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1,2, HBsAg, антитела к вирусу гепатита С, инаktivированная прогреванием. Прозрачная или опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 4,0 мл	2 флакона по 4,0 мл	2 флакона по 4,0 мл	1 флакон 5,0 мл
АНТИ-HBs-ПЛЮС – козьи антитела, содержащие антитела к HBsAg, внесенные в сыворотку крови человека, не содержащую HBsAg, антитела к HBsAg, ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инаktivированную прогреванием. Прозрачная розового цвета жидкость.	-	-	-	1 флакон 2,0 мл
АНТИ-HBs-МИНУС – козьи антитела, не содержащие антитела к HBsAg, внесенные в сыворотку крови человека, не содержащую HBsAg, антитела к HBsAg, ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инаktivированную прогреванием. Прозрачная голубого цвета жидкость.	-	-	-	1 флакон 2,0 мл
Промывочный раствор (концентрат х 25). Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании.	1 флакон 50,0 мл	1 флакон 120,0 мл	2 флакона по 120,0 мл	1 флакон 50,0 мл
СБ – субстратный буферный раствор, цитратный буфер, содержащий раствор водорода перекиси. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	3 флакона по 25,0 мл или 2 флакона по 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл
Хромоген ТМБ – раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндегидрохлорид. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	2 флакона по 3,5 мл	1 флакон 2,5 мл
Стоп-реагент – раствор серной кислоты 0,2 моль/л. Прозрачная, бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	1 флакон 50,0 мл	2 флакона по 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами.

Набор упакован в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывается инструкция по применению.

		Комплект 1	Комплект 2	Комплект 3	Комплект 4
Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшета	1 шт	2 шт	3 шт	1 шт
	Одноразовые наконечники	16 шт	32 шт	80 шт	16 шт
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт	4 шт	10 шт	2 шт
	Пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или пакет полиэтиленовый с замком Zip-Lock	1 шт	2 шт	3 шт	1 шт

III. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с температурой от 18 до 24 °С.
- Нельзя использовать реагенты с истекшим сроком годности.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий и смешивать их в процессе приготовления растворов.
- Перед использованием все реагенты выдержать при температуре от 18 до 24 °С в течение 30 мин.
- Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить тест в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на ферментативную активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта или предпочтительно использование материалов одноразового использования.
- Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной. Многоцветные ванночки для автоматических анализаторов необходимо сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной. Затем промыть 70% раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной.
- Посуду для работы с субстратной смесью (ванночки, флаконы и т.д.) в случае повторного использования необходимо сразу после работы промыть 70% раствором этилового спирта, а затем водой дистиллированной.
- Иммуносорбент допускается хранить в промежутках между отдельными операциями не более 10 мин (нельзя допускать высыхания лунок планшета).
- Ферментативная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстратов.
- Необходимо использовать новый наконечник для каждого образца.
- Промывка лунок – важный этап в данной процедуре: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполнены, не допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.
- Нельзя использовать одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и растворов.
- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование.
- Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию тепла или света во время инкубации и хранения.

IV. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для диагностики “in vitro”.
- Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении контрольного отрицательного образца, контрольного положительного образца, контрольного слабоположительного образца, АНТИ-НВs-ПЛЮС, АНТИ-НВs-МИНУС, были протестированы и определены неактивными в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В (НВsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к гепатиту С и ВИЧ-1,2.
- При работе с исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- В помещение с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спец. одежду и одноразовые перчатки, тщательно мыть руки после работы с ними.
- Необходимо избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы. При распыливании немедленно дезинфицировать поверхность 3% раствором хлорамина Б.
- Необходимо избегать контакта субстратного буфера, хромогена, стоп-реагента с кожей и слизистыми.

- После проведения ферментативной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кГ/см² (0,15 МПа). Допустимо обеззараживание твердых отходов способом погружения в 3% раствор хлорамина Б (длительность дезинфекции не менее 1 часа) или другого разрешенного к промышленному выпуску и применению в РФ дезинфицирующего средства. Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кГ/см² (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.

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

- Вода дистиллированная.
- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или предварительно устанавливаемые одноканальные или многоканальные пипетки с изменяемым объемом для отбора жидкостей.
- Одноразовые наконечники к пипеткам.
- Инкубатор микропланшетный или термостатируемый шейкер – (42,0 ± 0,5) °С или (37,0 ± 0,5) °С.
- Автоматический микропланшетный вошер.
- Градуированные цилиндры: 25 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Микропланшетный ридер с возможностью измерения оптической плотности (ОП) при фильтрах 450 нм и 620-680 нм.
- При проведении анализа на автоматическом анализаторе для ИФА на планшетах – автоматический анализатор открытого типа (например «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN»).

VI. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови должен проводиться в соответствии с текущей практикой. В качестве исследуемых образцов могут быть использованы сыворотка (плазма) крови человека или препараты крови. Сыворотку от эритроцитов или плазму от сгустка следует отделить как можно быстрее, чтобы избежать гемолиза. Гемолиз может повлиять на рабочие характеристики теста. Образцы, содержащие видимые частицы, следует осветлить центрифугированием до проведения теста. Взвешенные частицы фибрина и агрегаты могут привести к ложноположительным результатам.

При анализе жидких препаратов крови, растворы альбумина предварительно развести в 2 раза рабочим раствором ПР, комплексные иммуноглобулиновые препараты (КИП) развести в 4 раза рабочим раствором ПР, другие жидкие препараты крови анализировать неразведенными; лиофильно высушенные препараты крови перед исследованием развести в соответствии с инструкцией по применению данного препарата.

Образцы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут, допустимо длительное хранение в замороженном состоянии при температуре минус 20 °С в течение 3 мес. Сыворотку (плазму) следует быстро размораживать в течение нескольких минут при температуре 40 °С в водяной бане. Нельзя использовать сыворотку (плазму), замороженную и размороженную более одного раза. Нельзя использовать сыворотку (плазму) загрязненную, с гемолизом, или гиперлипидемией или консервированную азидом натрия.

VII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:

- **К-** – контрольный отрицательный образец;
- **К+1** – контрольный положительный образец;
- **РРК** – раствор для разведения конъюгата;
- **АНТИ-НВs-ПЛЮС** (нейтрализующий реагент);
- **АНТИ-НВs-МИНУС** (контрольный реагент);
- **Стоп-реагент.**

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

- **Иммуносорбент.** Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть пакет и вынуть планшет. Взять нужное количество стрипов. Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать (не удаляя осушитель!). Для этого поместить вскрытый пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или край пакета с иммуносорбентом свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета.
- **К+2 – контрольный слабоположительный образец.** Содержимое флакона с лиофилизированным К+2 растворить в воде дистиллированной в объеме, указанном на этикетке флакона, осторожно перемешать и выдержать до использования 5-10 мин. Регидратированный реагент К+2 после растворения должен представлять собой опалесцирующую жидкость светло-желтого цвета. Титрование К+2 и растворение его в других объемах воды дистиллированной не производить! Раствор стабилен не более 6 ч при температуре от 18 до 24 °С.
- **Рабочий промывочный раствор (ПР).** Содержимое флакона с концентратом (х 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимый объем концентрата (х 25) промывочного раствора развести соответствующим объемом воды дистиллированной (см. табл. № 2 и 3). Полученный раствор тщательно перемешать. Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут при температуре от 18 до 24 °С или 28 сут при температуре от 2 до 8 °С.
- **Рабочий раствор конъюгата.** Для приготовления рабочего раствора конъюгата необходимый объем концентрата (х 11) Конъюгата развести соответствующим объемом РРК (см. табл. № 2 и 3). Полученный раствор осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Рабочий раствор конъюгата стабилен не более 12 ч в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С.
- **Субстратная смесь (СС).** Готовить перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (см. табл. № 2 и 3), тщательно перемешать до полного растворения. Допустимо хранение СС не более 10 ч в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С в химически чистых флаконах или специальной емкости, предназначенной для постановки ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

3. Хранение неиспользованных реагентов

После вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными реагенты допускается хранить: ПР (концентрат х 25), К+1, К-, РРК, конъюгат (концентрат х 11), СБ, ТМБ, стоп-реагент, АНТИ-НВs-ПЛЮС, АНТИ-НВs-МИНУС – во флаконах, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. Иммуносорбент после вскрытия пакета допускается хранить в течение 6 мес при температуре от 2 до 8 °С.

VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблице 2:

Таблица 2

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

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц x 11) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
1	3,0	72,0	0,05	0,5	0,1	1,0
2	6,0	144,0	0,10	1,0	0,2	2,0
3	9,0	216,0	0,15	1,5	0,3	3,0
4	12,0	288,0	0,20	2,0	0,4	4,0
5	15,0	360,0	0,25	2,5	0,5	5,0
6	18,0	432,0	0,30	3,0	0,6	6,0
7	21,0	504,0	0,35	3,5	0,7	7,0
8	24,0	576,0	0,40	4,0	0,8	8,0
9	27,0	648,0	0,45	4,5	0,9	9,0
10	30,0	720,0	0,50	5,0	1,0	10,0
11	33,0	792,0	0,55	5,5	1,1	11,0
12 (целый планшет)	40,0	960,0	0,70	7,0	1,2	12,0

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

Проведение ИФА

Процедура 1 – инкубатор микропланшетный (42,0 ± 0,5) °С:

1. При одновременной постановке на целом планшете: в 4 лунки иммуносорбента пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К-, в 1 лунку – 100 мкл К+1, в 3 лунки – по 100 мкл К+2 для контроля чувствительности тест-системы.

При дробной постановке на стрипах планшета: в 2 лунки иммуносорбента пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К-, в 1 лунку – 100 мкл К+1, в 2 лунки – по 100 мкл К+2 для контроля чувствительности тест-системы (чувствительность тест-системы определяют только в одном из 12-ти стрипов иммуносорбента).

В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых образцов. Далее во все использованные лунки добавить по 50 мкл рабочего раствора конъюгата. При добавлении конъюгата не следует допускать случайного заноса образца из одного стрипа (ряда лунок) в другой через наконечники. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краю планшета, после чего покрытый крышкой планшет выдержать в течение 2 ч в инкубаторе микропланшетном при температуре (42,0 ± 0,5) °С в условиях влажной камеры (в качестве влажной камеры может быть использован полиэтиленовый пакет с вложенной в него ватой (марлей) или фильтровальной бумагой, смоченной водой).

2. Содержимое лунок удалить в емкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 4 раза рабочим ПР. Для этого осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета с помощью промывочного устройства до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 с, затем удалить промывочный раствор в емкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использовать автоматический микропланшетный вошер. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.*

3. Во все лунки планшета внести по 100 мкл СС и выдержать в защищенном от света месте в течение 20 мин при температуре от 18 до 24 °С или в течение 15 мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

4. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 150 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин провести учет результатов.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении.

* Для исключения неспецифического окрашивания раствора в лунках планшета с целью удаления остатков конъюгата с поверхности иммуносорбента, после промывки ПР допускается ополаскивание иммуносорбента дистиллированной водой (заливая весь планшет и вытряхивая над емкостью) с последующим удалением остатков влаги путем отстукивания по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаги. Данную операцию проводить с использованием средств индивидуальной защиты (резиновых перчаток, защитных очков или экрана), использованную фильтровальную бумагу поместить в емкость с дезинфицирующим раствором.

Процедура 2 – инкубатор микропланшетный (37,0 ± 0,5) °С:

1. При одновременной постановке на целом планшете: в 4 лунки иммуносорбента пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К-, в 1 лунку – 100 мкл К+1, в 3 лунки – по 100 мкл К+2 для контроля чувствительности тест-системы.

При дробной постановке на стрипах планшета: в 2 лунки иммуносорбента пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К-, в 1 лунку – 100 мкл К+1, в 2 лунки – по 100 мкл К+2 для контроля чувствительности тест-системы (чувствительность тест-системы определяют только в одном из 12-ти стрипов иммуносорбента).

В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых образцов. Далее во все использованные лунки добавить по 50 мкл рабочего раствора конъюгата. При добавлении конъюгата не следует допускать случайного заноса образца из одного стрипа (ряда лунок) в другой через наконечники. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краю планшета, после чего покрытый крышкой планшет выдержать в течение 2 ч в инкубаторе микропланшетном при температуре (37,0 ± 0,5) °С в условиях влажной камеры (в качестве влажной камеры может быть использован полиэтиленовый пакет с вложенной в него ватой (марлей) или фильтровальной бумагой, смоченной водой).

2. Далее анализ проводить аналогично п. 2, 3, 4 Процедуры 1.
Схема проведения ИФА приведена в Приложении.

Процедура 3 – термостатируемый шейкер (42,0 ± 0,5) °С:

1. При одновременной постановке на целом планшете: в 4 лунки иммуносорбента пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К-, в 1 лунку – 100 мкл К+1, в 3 лунки – по 100 мкл К+2 для контроля чувствительности тест-системы.

При дробной постановке на стрипах планшета: в 2 лунки иммуносорбента пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К-, в 1 лунку – 100 мкл К+1, в 2 лунки – по 100 мкл К+2 для контроля чувствительности тест-системы (чувствительность тест-системы определяют только в одном из 12-ти стрипов иммуносорбента).

В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых образцов. Далее во все использованные лунки добавить по 50 мкл рабочего раствора конъюгата. При добавлении конъюгата не следует допускать случайного заноса образца из одного стрипа (ряда лунок) в другой через наконечники. Планшет без крышки выдержать в течение 1 ч в термошейкере при 500 об/мин и температуре (42,0 ± 0,5) °С.

2. Содержимое лунок удалить в емкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 4 раза рабочим ПР. Для этого осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета с помощью промывочного устройства до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 с, затем удалить промывочный раствор в емкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использовать автоматический микропланшетный вошер. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.*

3. Во все лунки планшета внести по 100 мкл СС и выдержать в защищенном от света месте в течение 20 мин месте при температуре от 18 до 24 °С или в течение 15 мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

4. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 150 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин провести учет результатов.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении.

Процедура 4 – термостатируемый шейкер (37,0 ± 0,5) °С:

1. При одновременной постановке на целом планшете: в 4 лунки иммуносорбента пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К-, в 1 лунку – 100 мкл К+1, в 3 лунки – по 100 мкл К+2 для контроля чувствительности тест-системы.

При дробной постановке на стрипах планшета: в 2 лунки иммуносорбента пипеткой переменного объема внести по 100 мкл К-, в 1 лунку – 100 мкл К+1, в 2 лунки – по 100 мкл К+2 для контроля чувствительности тест-системы (чувствительность тест-системы определяют только в одном из 12-ти стрипов иммуносорбента).

В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых образцов. Далее во все использованные лунки добавить по 50 мкл рабочего раствора конъюгата. При добавлении конъюгата не следует допускать случайного заноса образца из одного стрипа (ряда лунок) в другой через наконечники. Планшет без крышки выдержать в течение 1 ч 30 мин в термошейкере при 500 об/мин и температуре (37,0 ± 0,5) °С.

2. Далее постановку анализа проводить аналогично п. 2, 3, 4 Процедуры 3.
Схема проведения ИФА приведена в Приложении.

5. **Проведение анализа в автоматическом режиме на автоматическом анализаторе типа «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN», Швейцария (возможна постановка на других моделях ИФА-анализаторов открытого типа).**

Таблица 3

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов или на один планшет при постановке ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		СС	
	ПР (конц x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат (конц x 11) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
4 (только для комплекта 1)	16,0	384,0	0,45	4,5	0,7	7,0
8 (только для комплекта 1)	32,0	768,0	0,70	7,0	1,2	12,0
12 (целый планшет)	40,0	960,0	0,70	7,0	1,2	12,0

5.1. Задать программу проведения ИФА и включить анализатор.

5.2. Приготовленный рабочий промывочный раствор залить в предназначенную для него емкость (входящую в комплект к ИФА-анализатору), остальные рабочие растворы и реагенты поместить в специальные контейнеры или емкости. Флаконы с контрольными образцами К+1, К+2 и К-, и флаконы или пробирки с исследуемыми образцами в объеме не менее 500 мкл установить в соответствующие штативы анализатора. В анализатор поместить необходимое количество планшетов. Далее постановку проводить в соответствии с инструкцией по применению ИФА-анализатора и программой проведения ИФА.

5.3. По окончании анализа прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов К+1, К+2 и К-.

5.4. Результаты анализа учитывать, если значение ОП в лунке с контрольным положительным образцом (К+1) не менее 0,6, а среднее значение в лунках с контрольным отрицательным образцом (К-) не более 0,12. Далее учет результатов проводить аналогично разделу IX.

6. **Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест-системы «ДС-ИФА-НВsAg» на автоматических ИФА-анализаторах:**

6.1. Контроль внесения образца рекомендуется проводить при длине волны 450 нм, критерий: ОП > 0,125.

6.2. Контроль внесения конъюгата рекомендуется проводить при длине волны 620 нм, критерий: ОП > 0,400.

IX. РЕЗУЛЬТАТЫ

Учет результатов провести спектрофотометрически при двух длинах волн – 450 нм и при референс-длине волны в диапазоне от 620 до 680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учёт результатов при одной длине волны – 450 нм.

Реакцию следует учитывать, если значение ОП в лунках с К+1 не менее 0,6, а среднее значение ОП в лунках с К- – не более 0,12. Если одно из значений ОП К- выходит за этот предел, его следует исключить из расчета среднего значения. Если исключению подлежат более одного значения ОП К-, анализ следует повторить. Положительными считают образцы со значениями ОП, равными или превышающими ОП критическое (ОП крит.).

ОП крит. рассчитывают по формуле:

$$\text{ОП крит.} = \text{ОП К- ср.} + 0,050,$$

где **0,050** – коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе.

Контрольный слабоположительный образец (К+2), содержащий HBsAg в концентрации $0,150 \pm 0,05$ МЕ/мл, должен давать положительную реакцию.

Положительные образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках для подтверждения первоначального результата. Если при повторном исследовании величина ОП образца в обеих лунках меньше ОП крит., то проба расценивается как негативная по HBsAg. Если при повторном анализе величина ОП образца в одной из лунок равна или больше ОП крит., то исходный результат подтверждается.

Все повторно положительные образцы должны быть протестированы в подтверждающем тесте, основанном на реакции нейтрализации.

X. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ ПОДТВЕРЖДАЮЩЕГО ТЕСТА

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблице 2 (раздел VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА).

Перед началом работы в зависимости от числа подлежащих подтверждению образцов определяют необходимое количество стрипов иммуносорбента, при этом следует учесть, что для подтверждения одного образца необходимы 2 лунки. При выполнении ИФА возможно использовать минимум 2 стрипа, один из которых (8 лунок) необходим для постановки контрольных образцов, а другой (8 лунок) – для подтверждения присутствия HBsAg в 4-х исследуемых образцах.

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

Проведение Подтверждающего теста.

Процедура 1 – инкубатор микропланшетный ($42,0 \pm 0,5$) °С:

1. В 3 лунки иммуносорбента пипеткой переменного объема внести дозатором по 100 мкл К-, в 1 лунку – 100 мкл К+1. ОП лунок с контрольным отрицательным образцом используют для подсчета среднего значения ОП К- (К- ср.) и значения ОП критического (ОП крит.). В эти лунки контрольный и нейтрализующий реагенты не вносить.

Для контроля подтверждающего теста (См. схему внесения реагентов, таблица 4) дополнительно в 2 лунки иммуносорбента внести по 100 мкл К+1 и в 2 лунки по 100 мкл К-.

В остальные лунки внести по 100 мкл подлежащих подтверждению образцов (каждый образец внести в 2 лунки).

Затем в первые лунки с контрольными образцами (К+1 и К-) и подтверждаемыми образцами добавить по 25 мкл контрольного реагента – АНТИ-HBs-МИНУС, во вторые – по 25 мкл нейтрализующего реагента – АНТИ-HBs-ПЛЮС.

Далее во все использованные лунки (в том числе и лунки с контрольными образцами без подтверждающих реагентов) добавить по 50 мкл рабочего раствора конъюгата. При добавлении конъюгата не следует допускать случайного заноса образца из одного стрипа (ряда лунок) в другой через наконечники.

Схема внесения реагентов

	1	2
A	К- 100 мкл	Образец № 1 100 мкл, АНТИ-НВs-МИНУС 25 мкл
B	К- 100 мкл	Образец № 1 100 мкл, АНТИ-НВs-ПЛЮС 25 мкл
C	К- 100 мкл	Образец № 2 100 мкл, АНТИ-НВs-МИНУС 25 мкл
D	К+1 100 мкл	Образец № 2 100 мкл, АНТИ-НВs-ПЛЮС 25 мкл
E	К- 100 мкл, АНТИ-НВs-МИНУС 25 мкл	Образец № 3 100 мкл, АНТИ-НВs-МИНУС 25 мкл
F	К- 100 мкл, АНТИ-НВs-ПЛЮС 25 мкл	Образец № 3 100 мкл, АНТИ-НВs-ПЛЮС 25 мкл
G	К+1 100 мкл, АНТИ-НВs-МИНУС 25 мкл	Образец № 4 100 мкл, АНТИ-НВs-МИНУС 25 мкл
H	К+1 100 мкл, АНТИ-НВs-ПЛЮС 25 мкл	Образец № 4 100 мкл, АНТИ-НВs-ПЛЮС 25 мкл

Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краю планшета, после чего покрытый крышкой планшет выдержать в инкубаторе микропланшетном в течение 2 ч при температуре $(42,0 \pm 0,5)$ °С в условиях влажной камеры (в качестве влажной камеры может быть использован полиэтиленовый пакет с вложенной в него ватой (марлей) или фильтровальной бумагой, смоченной водой).

2. Содержимое лунок удалить в емкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 4 раза рабочим ПР. Для этого осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета с помощью промывочного устройства до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек, затем удалить промывочный раствор в емкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использовать автоматический микропланшетный вошер. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.*

3. Во все лунки иммуносорбента внести по 100 мкл СС и выдержать в защищенном от света месте в течение 20 мин при температуре от 18 до 24 °С или в течение 15 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С.

4. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 150 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин провести учет результатов.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении.

Процедура 2 – инкубатор микропланшетный (37,0 ± 0,5) °С:

1. В 3 лунки иммуносорбента пипеткой переменного объема внести дозатором по 100 мкл К-, в 1 лунку – 100 мкл К+1. ОП лунок с контрольным отрицательным образцом используют для подсчета среднего значения ОП К- (К- ср.) и значения ОП критического (ОП крит.). В эти лунки контрольный и нейтрализующий реагенты не вносить.

Для контроля подтверждающего теста (См. схему внесения реагентов) дополнительно в 2 лунки иммуносорбента внести по 100 мкл К+1 и в 2 лунки по 100 мкл К-.

В остальные лунки внести по 100 мкл подлежащих подтверждению образцов (каждый образец внести в 2 лунки).

Затем в первые лунки с контрольными образцами (К+1 и К-) и подтверждаемыми образцами добавить по 25 мкл контрольного реагента – АНТИ-НВs-МИНУС, во вторые – по 25 мкл нейтрализующего реагента – АНТИ-НВs-ПЛЮС.

Далее во все использованные лунки (в том числе и лунки с контрольными образцами без подтверждающих реагентов) добавить по 50 мкл рабочего раствора конъюгата. При добавлении конъюгата не следует допускать случайного заноса образца из одного стрипа (ряда лунок) в другой через наконечники.

Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краю планшета, после чего, покрытый крышкой планшет, выдержать в течение 2 ч в инкубаторе микропланшетном при температуре (37,0 ± 0,5) °С в условиях влажной камеры (в качестве влажной камеры может быть использован полиэтиленовый пакет с вложенной в него ватой (марлей) или фильтровальной бумагой, смоченной водой).

2. Далее анализ проводить аналогично п. 2, 3, 4 Процедуры 1.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении.

Процедура 3 – термостатируемый шейкер (42,0 ± 0,5) °С:

1. В 3 лунки иммуносорбента пипеткой переменного объема внести дозатором по 100 мкл К-, в 1 лунку – 100 мкл К+1. ОП лунок с контрольным отрицательным образцом используют для подсчета среднего значения ОП К- (К- ср.) и значения ОП критического (ОП крит.). В эти лунки контрольный и нейтрализующий реагенты не вносить.

Для контроля подтверждающего теста (См. схему внесения реагентов) дополнительно в 2 лунки иммуносорбента внести по 100 мкл К+1 и в 2 лунки по 100 мкл К-.

В остальные лунки внести по 100 мкл подлежащих подтверждению образцов (каждый образец внести в 2 лунки).

Затем в первые лунки с контрольными образцами (К+1 и К-) и подтверждаемыми образцами добавить по 25 мкл контрольного реагента – АНТИ-НВs-МИНУС, во вторые – по 25 мкл нейтрализующего реагента – АНТИ-НВs-ПЛЮС.

Далее во все использованные лунки (в том числе и лунки с контрольными образцами без подтверждающих реагентов) добавить по 50 мкл рабочего раствора конъюгата. При добавлении конъюгата не следует допускать случайного заноса образца из одного стрипа (ряда лунок) в другой через наконечники.

Планшет без крышки выдержать в течение 1 ч в термошейкере при 500 об/мин и температуре (42,0 ± 0,5) °С.

2. Содержимое лунок удалить в емкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 4 раза рабочим ПР. Для этого осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета с помощью промывочного устройства до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек, затем удалить промывочный раствор в емкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использовать автоматический микропланшетный вошер. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.*

3. Во все лунки иммуносорбента внести по 100 мкл СС и выдержать в защищенном от света месте в течение 20 мин при температуре от 18 до 24 °С или в течение 15 мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

4. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 150 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин провести учет результатов.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении.

Процедура 4 – термостатируемый шейкер (37,0 ± 0,5) °С:

1. В 3 лунки иммуносорбента пипеткой переменного объема внести дозатором по 100 мкл К-, в 1 лунку – 100 мкл К+1. ОП лунок с контрольным отрицательным образцом используют для подсчета среднего значения ОП К- (К- ср.) и значения ОП критического (ОП крит.). В эти лунки контрольный и нейтрализующий реагенты не вносить.

Для контроля подтверждающего теста (См. схему внесения реагентов) дополнительно в 2 лунки иммуносорбента внести по 100 мкл К+1 и в 2 лунки по 100 мкл К-.

В остальные лунки внести по 100 мкл подлежащих подтверждению образцов (каждый образец внести в 2 лунки).

Затем в первые лунки с контрольными образцами (К+1 и К-) и подтверждаемыми образцами добавить по 25 мкл контрольного реагента – АНТИ-НВs-МИНУС, во вторые – по 25 мкл нейтрализующего реагента – АНТИ-НВs-ПЛЮС.

Далее во все использованные лунки (в том числе и лунки с контрольными образцами без подтверждающих реагентов) добавить по 50 мкл рабочего раствора конъюгата. При добавлении конъюгата не следует допускать случайного заноса образца из одного стрипа (ряда лунок) в другой через наконечники.

Планшет без крышки выдержать в течение 1 ч 30 мин в термошейкере при 500 об/мин и температуре (37,0 ± 0,5) °С.

2. Далее анализ проводить аналогично п. 2, 3, 4 Процедуры 3.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении.

5. Проведение анализа в автоматическом режиме на автоматическом анализаторе типа «ТЕСАН Freedom EVOlyzer» производства фирмы «ТЕСАН», Швейцария (возможна постановка на других моделях ИФА-анализаторов открытого типа).

Необходимые объемы реагентов представлены в таблице 3 (раздел VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА). Постановку проводить аналогично п. 5 раздела VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

XI. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОДТВЕРЖДАЮЩЕГО ТЕСТА

Оценку валидности проведения теста по оптической плотности контрольного отрицательного образца, контрольного положительного образца и контрольного слабоположительного образца проводить согласно разделу IX. Значения ОП в лунках с К- после внесения АНТИ-НВs-МИНУС и АНТИ-НВs-ПЛЮС должны быть ниже ОП крит.

Присутствие поверхностного антигена гепатита В (НВsАg) в исследуемых образцах и К+1 определяется показателем нейтрализации – это соотношение значений оптической плотности образца после нейтрализации и значений оптической плотности образца до нейтрализации.

Показатель нейтрализации (%) определяется по формуле:

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

где **ОПк** – оптическая плотность образца после внесения АНТИ-НВs-МИНУС;

ОПн – оптическая плотность образца после внесения АНТИ-НВs-ПЛЮС;

ОП К-ср – среднее значение оптической плотности контрольного отрицательного образца.

Образец считается положительным, если показатель нейтрализации $\geq 50\%$.

Показатель нейтрализации ОП К+1 должен быть $\geq 50\%$.

Образец с ОП $\geq 1,0$, не подвергшийся нейтрализации, следует развести в 25 раз рабочим промыочным раствором и повторить тестирование. Если после разведения в 25 раз сохраняются высокие значения ОП и образец не подвергается нейтрализации, то рекомендуется развести исходный образец в 50 раз и более (100, 200 и т.д.) и снова провести анализ. Если образец, разведенный в 50 и более раз, подвергается нейтрализации более чем на 50%, то его следует считать положительным. Если показатель нейтрализации менее 50% считать образец отрицательным.

Диагностическая чувствительность и специфичность набора “ДС-ИФА-НВsАg”

Диагностическая чувствительность – 99,60%, специфичность – 99,40%.

ХII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности указан на упаковке набора. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Хранение – в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование – при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование от 9 до 20 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя – ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

Для проведения расследования и получения объективных выводов по заявленной рекламации необходимо предоставление:

1. Рекламационного набора;
2. Всех образцов кроводач пациента;
3. Протоколов исследований с использованием других методов с указанием серии, сроков годности;
4. Протоколов исследований с использованием референтных тестов с указанием серии, сроков годности.

ХIII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

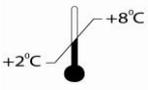
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Производитель
	Каталожный номер
	Количество определений
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности число/месяц/год
	Использовать инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

СХЕМА АНАЛИЗА

1	Внести	По 100 мкл К-, К+1, К+2 (К+2 вносить для комплектов 1, 2, 3)
2	Внести	По 100 мкл исследуемых образцов
3	Внести	По 25 мкл АНТИ-НВs-ПЛЮС, АНТИ-НВs-МИНУС (п. 3 выполнять только при использовании комплекта 4)
4	Внести	По 50 мкл рабочего раствора конъюгата
5	Инкубировать	Процедура 1: 2 часа, $(42,0 \pm 0,5)$ °С, инкубатор микропланшетный Процедура 2: 2 часа, $(37,0 \pm 0,5)$ °С, инкубатор микропланшетный Процедура 3: 1 час, $(42,0 \pm 0,5)$ °С, 500 об/мин, термошейкер Процедура 4: 1 час 30 мин, $(37,0 \pm 0,5)$ °С, 500 об/мин, термошейкер
6	Промыть планшет	Рабочий ПР, не менее 380 мкл, 4 раза
7	Внести	По 100 мкл СС
8	Инкубировать	20 мин, 18-24 °С, в защищенном от света месте или 15 мин, $(37,0 \pm 0,5)$ °С, в защищенном от света месте
9	Внести	По 150 мкл стоп-реагента
10	Учет результатов	450 нм/620-680 нм или 450 нм

