





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

І Н С Т Р У К Ц І Я
з використання набору реагентів
«ДСУ-ІФА-НВsAg»

**Тест-система імуноферментна для виявлення або підтвердження
поверхневого антигену вірусу гепатиту В,
набір діагностичний**

Зміст

I. Призначення.....	3
II. Принцип тесту.....	3
III. Склад набору реагентів.....	3
IV. Аналітичні характеристики.....	5
V. Заходи безпеки	6
VI. Утилізація та знищення.....	7
VII. Необхідні матеріали та обладнання, що не поставляються з набором реагентів ...	7
VIII. Відбір та підготовка зразків.....	7
IX. Підготовка реагентів.....	7
X. Проведення аналізу.....	8
XI. Облік результатів	10
XII. Обмеження тесту.....	11
XIII. Строк придатності. Умови зберігання та транспортування	11
XIV. Гарантійні зобов'язання	12
XV. Пояснення символів.....	13
Додаток	14

Набір реагентів випускається у чотирьох комплектах:**Комплекти 1, 2, 3 - для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В :**

Комплект 1 розрахований на проведення 96 (один розбірний планшет) визначень, включаючи контрольні, призначений для ручної постановки, так і для постановки на ІФА-аналізаторах відкритого типу з можливістю дробового використання.

Комплект 2 розрахований на проведення 192 (два розбірних планшета) визначень, включаючи контрольні, призначений як для ручної постановки з можливістю дробового використання, так і для одночасної постановки на ІФА-аналізаторах відкритого типу.

Комплект 3 розрахований на проведення 480 (п'ять розбірних планшетів) визначень, включаючи контрольні, призначений для ручної постановки з можливістю дробового використання, так і для одночасної постановки на ІФА-аналізаторах відкритого типу.

Комплект 4 - для підтвердження поверхневого антигену вірусу гепатиту В, розрахований на проведення 48 (один розбірний планшет) визначень, включаючи контрольні, призначений для ручної постановки, так і для постановки на ІФА-аналізаторах відкритого типу з можливістю дробового використання (по два стрипа).

I. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів "ДСУ-ІФА-НВsAg" Тест-система імуноферментна для виявлення або підтвердження поверхневого антигену вірусу гепатиту В призначений для виявлення або підтвердження НВsAg в зразках сироватки (плазми) крові людини, препаратах, виготовлених з крові людини (альбуміні, інтерфероні лейкоцитарному). Можливе виявлення або підтвердження, як диких типів, так і мутантних варіантів поверхневого антигену вірусу гепатиту В.

Вірусний гепатит В – широко розповсюджене інфекційне захворювання, викликане однойменним вірусом (HBV). НВsAg – основний серологічний маркер HBV-інфекції. Область застосування тест-системи «ДСУ-ІФА-НВsAg» – клінічна лабораторна діагностика HBV-інфекції, скринінг донорської крові.

II. ПРИНЦИП ТЕСТА

Принцип дії набору реагентів «ДСУ-ІФА-НВsAg» заснований на твердофазному ІФА (одностадійний «сендвіч»-варіант). НВsAg в досліджуваному зразку одночасно зв'язується з антитілами до НВsAg, сорбованими в лунках планшета, і з антитілами до НВsAg, міченими пероксидазою хрому, у кон'югаті. Реагенти, що не зв'язалися видаляються в ході промивання. Далі додається субстратна суміш на основі ТМБ. Реакція зупиняється додаванням сірчаної кислоти. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації НВsAg в досліджуваному зразку.

Підтвердження наявності НВsAg у зразку базується на реакції нейтралізації. До досліджуваного зразку додається нейтралізуючий реагент, що містить поліклональні антитіла до НВsAg, які зв'язують НВsAg і роблять неможливим утворення комплексу НВsAg з антитілами у складі імуносорбенту і кон'югату.

III. СКЛАД НАБОРУ РЕАГЕНТІВ

3.1. Склад набору:

Таблиця 1

Характеристики реагентів		Форма випуску			
		Комплект 1	Комплект 2	Комплект 3	Комплект 4
Імуносорбент	Планшет полістироловий 96-лунковий розбірний до стрипів (або до лунок), в лунках якого сорбовані антитіла до НВsAg (анти-НВs).	1 планшет	2 планшета	5 планшетів	1 планшет
Кон'югат	Концентрат (x11). Анти-НВs, мічені пероксидазою хрому. Прозора або опалесцююча безбарвна або світло-жовтого кольору рідина.	1 флакон 1,2 мл	1 флакон 1,2 мл	1 флакон 3,6 мл або 3 флакона по 1,2 мл	1 флакон 1,2 мл

РРК	Розчин для розведення Кон'югату. Опалесцююча блакитного кольору рідина, допустиме утворення осаду, що розчиняється при струшуванні. Містить 0,2% ProClin 300.	1 флакон 12,0 мл	1 флакон 12,0 мл	3 флакона по 12,0 мл або 2 флакона по 18,0 мл	1 флакон 12,0 мл
К+1	Контрольний позитивний зразок, інактивований, що містить HBsAg. Прозора або злегка опалесцююча червоного кольору рідина.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл
К+2	Контрольний слабопозитивний зразок, інактивований, що містить HBsAg з концентрацією 0,150 ± 0,05 МЕ/мл. Ліофілізований. Суха пориста аморфна білого або світло-жовтого кольору маса. або Рідкий, готовий до застосування. Прозора або опалесцююча помаранчевого кольору рідина.	1 флакон 1 флакон 2,5 мл	2 флакона 1 флакон 2,5 мл	5 флаконів 1 флакон 2,5 мл	-
К-	Контрольний негативний зразок, інактивований. Прозора або опалесцююча зеленого кольору рідина.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	2 флакони по 2,5 мл або 1 флакона 5,0 мл	1 флакон 2,5 мл
ПР	Промивний розчин. Концентрат (x25) фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Т). Прозора або злегка опалесцююча безбарвна або світло-жовтого кольору рідина. Допустимо утворення осаду, повністю розчиняється при температурі від 35 до 39 °С і струшуванні.	1 флакон 50,0 мл або 1 флакон 120,0 мл	2 флакона по 50,0 мл або 1 флакон 120,0 мл	4 флакона по 50,0 мл або 2 флакона по 120,0 мл	1 флакон 50,0 мл або 1 флакон 120 мл
Стоп-реагент	Розчин сірчаної кислоти 0,2 М). Прозора безбарвна рідина.	1 флакон 25,0 мл або 1 флакон 50 мл	2 флакона по 25,0 мл або 1 флакон 50,0 мл	4 флакона по 25,0 мл або 2 флакона по 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл або 1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратний розчин	ТМБ-Субстратний розчин. Прозора безбарвна або світло-жовтого кольору рідина.	1 флакон 14,0 мл або 1 флакон 25,0 мл	2 флакона по 14,0 мл або 1 флакон 25,0 мл	5 флаконів по 14,0 мл або 3 флакона по 25,0 мл або 1 флакон 60,0 мл	1 флакон 14,0 мл
або СБ	Субстратний буферний розчин - цитратний буфер, що містить розчин перекису водню. Прозора безбарвна рідина.	або 1 флакон 25,0 мл або 1 флакон 50,0 мл	або 1 флакон 25,0 мл або 1 флакон 50,0 мл	або 3 флакона по 25,0 мл або 2 флакона по 50,0 мл	або 1 флакон 25,0 мл або 1 флакон 50,0 мл

та ТМБ	Концентрат (x11). Розчин, що містить 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Прозора безбарвна або світло-жовтого кольору рідина.	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	3 флакона по 2,5 мл або 2 флакона по 3,5 мл	1 флакон 2,5 мл
АНТИ-НВs-ПЛЮС	Нейтралізуючий реагент, інактивований. Прозора рожевого кольору рідина.	-	-	-	1 флакон 2,0 мл
АНТИ-НВs-МІНУС	Контрольний реагент, інактивований. Прозора блакитного кольору рідина.	-	-	-	1 флакон 2,0 мл

Набір комплектується готовими реагентами та концентрованими розчинами. Присутнє маркування за допомогою штрих-кодів, а також кольорове кодування для ряду реагентів. Кольорове кодування реагентів – умовне позначення кольору/окрасу рідких реагентів. К+1 – червоний, К+2 (рідкий) – помаранчевий, К- -зелений.

Реагенти набору поміщають у споживчу упаковку (коробку фасувальну). Кожна упаковка має інструкцію по застосуванню.

3.2. Приналежності:

- захисні плівки для ІФА-планшетів: комплект 1 (1 шт.), комплект 2 (2 шт.), комплект 3 (5 шт.), комплект 4 (1 шт.);
- одноразові наконечники: комплект 1 (16 шт.), комплект 2 (32 шт.), комплект 3 (80 шт.), комплект 4 (16 шт.);
- ванночки пластикові для рідких реагентів: 1 комплект (2 шт.), комплект 2 (4 шт.), комплект 3 (10 шт.), комплект 4 (2 шт.);
- пакети поліетиленові з замком Zip-Lock: комплект 1 (1 шт.), комплект 2 (2 шт.), комплект 3 (3 шт.), комплект 4 (1 шт.).

3.3. У комплект поставки входять: набір реагентів (додатково може бути укомплектований приладдям), інструкція із застосування, паспорт.

IV. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. **Аналітична чутливість** оцінювалася з використанням міжнародних стандартів:

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

Рівень чутливості тест-системи при детекції поверхневого антигену гепатиту В (HBsAg) становить: 0,1 МЕ/мл (термостат); 0,05 МЕ/мл (термошейкер); 0,01 МЕ/мл (термостат (37 ± 1,0) ° C, 18 годин).

Чутливість набору реагентів при виявленні поверхневого антигену вірусу гепатиту В:

- в альбуміні – 1,0 МЕ/мл (термостат); 0,5 МЕ/мл (термошейкер);
- в інтерфероні лейкоцитарному – 0,5 МЕ/мл (термостат); 0,25 МЕ/мл (термошейкер).

4.2. **Діагностична чутливість** оцінювалася при дослідженні:

- 453 зразки сироватки (плазми) крові пацієнтів з гострим та хронічним гепатитом В і склали 100% (95% CI: (99,2-100%).
- 11 комерційних сіроконверсійних панелей (BVI і ZeptoMetrix, США). З 176 зразків сіроконверсійних панелей «ДСУ-ІФА-НВsAg» виявив як позитивні 53 зразка. Набір реагентів «ДСУ-ІФА-НВsAg» виявив НВV інфекцію в середньому через 70,45 днів після першої кроводачі (для даного набору панелей).
- Панелі HBsAg native mutants in CDP Plasma (Trina Code: DH1200, Trina Bioreactives AG). З 48 зразків панелі виявлено 47.

4.3. **Специфічність** оцінювалася при дослідженні:

- 5010 зразків сироватки (плазми) крові донорів випадкової вибірки. Специфічність склали 99,9% (95% CI: (99,82-99,98%).
- 770 зразків сироватки (плазми) крові людини від клінічних пацієнтів з гепатитом С. Специфічність

становила 99,6% (95%СІ: (98,86-99,87%).

- 246 зразків сироватки (плазми) крові вагітних жінок. Специфічність становила 99,6% (95%СІ: (97,73-99,93%).
- 194 зразків сироватки (плазми) крові від клінічних пацієнтів з різними неінфекційними захворюваннями. Специфічність становила 99,5% (95%СІ: (97,14-99, 91%).
- 50 зразків препаратів крові людини:
 - 35 зразків альбуміну. Специфічність становила 100% (95%СІ: (90,11-100%);
 - 15 зразків інтерферону лейкоцитарного. Специфічність становила 100% (95%СІ: (79,61-100%).

Якщо процедура отримання і підготовки зразків для дослідження, не відповідає вимогам, викладених у п. VIII цієї інструкції, показники специфічності можуть відрізнятися від зазначених.

4.4. Відтворюваність

Відтворюваність оцінена з використанням 3 позитивних зразків усередині планшета і між планшетами на трьох серіях набору реагентів. Коефіцієнти варіації не перевищили 10%.

Для оцінки варіабельності тесту було протестовано 3 зразка сироватки крові людини з високим, середнім та низьким вмістом НВsAg.

Для оцінки внутрішньопланшетної відтворюваності ці зразки були протестовані 25 разів в одній постановці «ДСУ-ІФА-НВsAg». Коефіцієнт варіації не перевищував 7%.

Для оцінки міжпланшетної відтворюваності ці зразки були протестовані в дублікатах протягом 3 днів двома різними операторами. Коефіцієнт варіації не перевищував 10%.

Для аналізу ризиків одержання хибнонегативних результатів при повторному тестуванні слабо позитивних зразків проведено повторне дослідження 3 зразків з ОП близькою до ОПкрит. З імовірністю 85,8% можна очікувати, що зразки з ОП \pm 20% від ОПкрит. будуть давати постійний результат при тестуванні у «ДСУ-ІФА-НВsAg».

4.5. Еквівалентність зразків сироватки та плазми крові людини

Додатковими дослідженнями колекції позитивних (n=25) і негативних (n=25) парних зразків сироватки і плазми була показана їх еквівалентність, що дозволяє віднести показники діагностичної чутливості та специфічності до обох видів досліджуваних зразків.

V. ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

- 5.1. Нестерильний медичний виріб для діагностики *in vitro*. Потенційний ризик застосування набору – перелік А.
- 5.2. Набор призначений для професійного використання у клінічній лабораторній діагностиці спеціально навченим персоналом.
- 5.3. Реагенти набору не містять шкідливих речовин в небезпечних концентраціях, за винятком реагентів, позначених символом «Увага». При їх попаданні на шкіру або слизові негайно промити великою кількістю води.
- 5.4. Контрольні зразки К+1, К+2, приготовані з використанням інактивованої сироватки (плазми) крові людини, не містить антиген р24 ВІЛ-1, антитіла до HCV, ВІЛ-1,2; містять НВsAg.
- 5.5. Контрольні зразки К-, АНТИ-НВs-ПЛЮС і АНТИ-НВs-МІНУС приготовані з використанням інактивованої сироватки (плазми) крові людини, не містить НВsAg, антиген р24 ВІЛ-1, антитіла до HCV, ВІЛ-1,2.
- 5.6. При роботі з реагентами набору (К+1, К+2, К-, АНТИ-НВs-ПЛЮС і АНТИ-НВs-МІНУС) і досліджуваними зразками треба поводитись як з потенційно небезпечними матеріалами, оскільки жоден відомий метод не може гарантувати відсутність інфекційних агентів.
- 5.7. Паспорт безпеки набору реагентів може бути представлений за запитом клієнта.
- 5.8. Для отримання надійних результатів необхідно:
 - забезпечити умови зберігання набору;
 - суворо дотримуватися вимог інструкції по застосуванню набору реагентів;
 - не використовувати набір за межами встановленого строку придатності.
- 5.9. Не використовувати набір, якщо при розкритті виявлено пошкодження пакета з Імуносорбентом, протіканні флаконів з рідкими реагентами, пошкодження флаконів з ліофілізованими реагентами.

VI. УТИЛІЗАЦІЯ ТА ЗНИЩЕННЯ

6.1. Відходи, які утворюються в результаті застосування набору реагентів (включаючи приладдя) за призначенням, встановленим виробником, а також невикористані вироби (закінчився термін придатності, пошкоджена споживча упаковка/маркування, пошкоджена упаковка/маркування реагентів і т. д.) підлягають знешкодженню та утилізації в відповідності з діючими правилами і нормами.

VII. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Вода дистильована (деіонізована).
- Дозатори піпеточні змінного об'єму для відбору рідин;
- Одноразові наконечники для дозаторів піпеточних;
- Інкубатор мікропланшетний (термостат) $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$;
- Термостатуючий шейкер (термошейкер) $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ або $(42,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$;
- Пристрій для промивання планшетів (вошер);
- Планшетний спектрофотометр (ІФА-рідер) з фільтрами 450 нм і 620-680 нм;
- Для постановки ІФА в автоматичному режимі – будь-яка модель ІФА-аналізаторів відкритого типу;
- Папір фільтрувальний лабораторний.

VIII. ВІДБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Збір зразків крові проводити у відповідності з поточною практикою методом венепункції.

Для аналізу використовувати:

- нерозведені зразки сироватки крові людини;
- нерозведені зразки плазми крові людини, що містять ЕДТА, цитрат натрію, гепарин.

Щоб уникнути гемолізу потрібно як можна швидше відділити плазму від еритроцитів або сироватку від згустка. Зразки, що містять агрегати або осад, освітлювати центрифугуванням при 1000-2000 об/хв (15 хв, при температурі від 2 до 8 °C).

Не використовувати для аналізу наступні зразки: термоінактивовані, консервовані азидом натрію, з бактеріальним ростом, вираженим гемолізом і гіперліпідемією.

Рідкі препарати крові досліджувати нерозведеними; ліофільно висушені препарати крові перед дослідженням розвести у відповідності з інструкцією щодо застосування даного препарату.

Зразки можна зберігати відповідно до вимог існуючих нормативних документів. Тривале зберігання допустимо при температурі не вище мінус 18 °C (заморожування/відтавання не більше 3 разів). Щоб уникнути осадження фібрину плазму розморожувати протягом декількох хвилин при температурі $(39,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на водяній бані.

IX. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

9.1. Загальні вимоги та рекомендації:

- Не можна використовувати реагенти з наборів різних серій або змішувати їх при приготуванні розчинів, крім:
 - неспецифічних реагентів (ІР, РБ), які взаємозамінні у всіх наборах реагентів виробництва ТОВ «Діагностичні системи Україна»;
 - Стоп-реагенту, який може бути взаємозамінним залежно від молярності розчину;
 - інші реагенти також можуть бути взаємозамінними для постановки в більшості тест-систем виробництва ТОВ «Діагностичні системи Україна»;
- Робочі розчини готувати обережно, виключаючи будь-які забруднення. Використовувати одноразовий або чистий ретельно вимитий лабораторний посуд для приготування реагентів. Не допускати контакту металевих предметів з Кон'югатом, ТМБ-Субстратним розчином або субстратною сумішшю.
- Не піддавати реагенти впливу високої температури або прямого сонячного світла.
- Перед використанням флакони з рідкими реагентами перемішати, не допускаючи спінювання.

9.2. Реагенти, готові до застосування:

- **Імуносорбент.** Планшет, що складається з 12 стрипів і рамки, упакований в фольгований пакет. Розкрити фольгований пакет, відступивши 1 см від краю пакета, і взяти необхідну кількість стрипів.
- К+1, К+2 (при комплектації набору рідким реагентом К+2), К-, Стоп-реагент (0,2 М), ТМБ-Субстратний розчин (при комплектації набору готовим ТМБ-Субстратним розчином), АНТИ-НВs-ПЛЮС, АНТИ-НВs-МІНУС.

9.3. Реагенти, що потребують попереднього приготування:

- К+2 (при комплектації набору ліофілізованим реагентом). Вміст флакона розчинити в об'ємі води дистильованої (деіонізованої), зазначеному на етикетці флакона, обережно перемішати і витримати до використання 5-10 хв.
- Робочий ПР. Необхідний об'єм концентрату ПР (×25) розвести в 25 разів відповідним обсягом води дистильованої (деіонізованої) (див. таблицю 2) і ретельно перемішати.
- Робочий Кон'югат. Необхідний об'єм концентрату Кон'югату (×11) розвести в 11 разів відповідним обсягом РРК (див. таблицю 2), обережно перемішати, не допускаючи спінювання.

Можливе приготування робочого розчину безпосередньо у флаконі з РРК. Для цього потрібно відібрати дозатором пипеточним концентрат Кон'югату (1,2 мл), перенести у флакон з РРК (12,0 мл) і ретельно перемішати, не допускаючи спінювання.

Увага! При постановці з інкубацією протягом 18 годин (процедура 1 – (термостат (37,0 ± 1,0)°С) об'єм концентрату Кон'югату (×11) для приготування робочого розчину Кон'югату може бути змінений. Кратність концентрату Кон'югату вказана на додатковій етикетці, на внутрішній стороні фасувальної коробки.

- Субстратна суміш (СС) (при комплектації набору СБ – субстратним буферним розчином і ТМБ (концентрат ×11)). Необхідний об'єм концентрату ТМБ (×11) розвести в 11 разів відповідним обсягом СБ (див. таблицю 2) і ретельно перемішати. Можливе приготування СС безпосередньо у флаконі з СБ. Для цього потрібно відібрати дозатором пипеточним необхідний обсяг ТМБ (2,5 мл або 5,0 мл), перенести у відповідний флакон з СБ (25,0 мл або 50,0 мл) і ретельно перемішати.

Таблиця 2

Витрата реагентів набору в залежності від кількості використовуваних стрипів при ручній постановці ІФА

Кількість використовуваних стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Робочий ПР	ПР (×25), мл	3,0	6,0	9,0	12,0	15,0	18,0	21,0	24,0	27,0	30,0	33,0	40,0
	Вода, мл	72,0	144,0	216,0	288,0	360,0	432,0	504,0	576,0	648,0	720,0	792,0	960,0
Робочий Кон'югат	Кон'югат (×11), мл	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,7
	РРК, мл	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	7,0
СС	ТМБ (×11), мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
	СБ, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

Х. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

10.1. Загальні вимоги та рекомендації:

- Використовувати валідовані дозатори та обладнання.
- Використовувати нові наконечники для кожного зразка.
- Перед використанням набір реагентів витримати не менше 30 хв при кімнатній температурі.
- Перед використанням ванночки пластикові для рідких реагентів обполоснути водою дистильованою (деіонізованою).

- Не використовувати одну і ту ж пластикову ванночку для внесення Кон'югату, ТМБ-Субстратного розчину і субстратної суміші.
- Уникати розплескування зразків або розчинів, що містять зразки.
- Не допускати висихання лунок Імуносорбенту між окремими операціями.
- Дотримуватися вимог до промивання (рекомендована кількість циклів, об'єм розчину при наповненні, тимчасові інтервали, ефективність відсмоктування).
- Багаторазові ванночки для ІФА-аналізаторів відразу після роботи промити водою дистильованою водою (деіонізованою). Потім прополоскати 70% розчином етилового спирту і знову сполоснути водою дистильованою (деіонізованою).

10.2. Проведення ІФА при ручній постановці:

Можливі три альтернативні процедури інкубації планшета. Дуже важливо, щоб кожен етап постановки реакції здійснювався за однією і тією ж процедурою. Поєднання процедур інкубації не допускається.

Процедура	Процедура 1 (термостат $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$)	Процедура 2 (термошейкер $(42,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$, 500 об/хв)	Процедура 3 (термошейкер $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$, 500 об/хв)
Етап			
Для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В			
1	Внести в лунки Імуносорбента по 100 мкл контрольних і досліджуваних зразків. 1-2 стрипа: 2 лунки – К-, 1 лунка – К+, 2 лунки – К+2. 3 стрипа і більше: 4 лунки – К-, 1 лунка – К+, 3 лунки – К+2. <i>К+2 використовують для контролю чутливості тест-системи. При дробовому використанні планшета достатньо однократної постановки К+2.</i>		
Для підтвердження поверхневого антигену вірусу гепатиту В			
1.1	Залежно від числа тих, що підлягають підтвердженню зразків визначити необхідну кількість стрипів Імуносорбенту. Для підтвердження одного зразка необхідні 2 лунки. Для внесення контрольних зразків необхідно зарезервувати 8 лунок.		
1.2	Внести в лунки Імуносорбенту по 100 мкл контрольних зразків: в 5 лунок – К-, у 3 лунки – К+. В інші лунки Імуносорбенту внести досліджувані зразки кожен в 2 лунки по 100 мкл.		
1.3	В одну лунку з К-, К+ та кожним досліджуваним зразком внести по 25 мкл реагенту АНТИ-НВs-МІНУС. В другу лунку с К-, К+ і кожним досліджуваним зразком внести по 25 мкл реагенту АНТИ-НВs-ПЛЮС.		
2	У всі лунки внести по 50 мкл робочого розчину Кон'югату. При додаванні Кон'югату не допускати занесення зразка з однієї лунки до іншої через наконечники.		
3	Планшет накрити захисною плівкою, щільно притиснувши по всій поверхні планшета, і інкубувати:	Планшет без захисної плівки інкубувати:	
	2 години або 18 годин	1 година	1 година 30 хвил
4	З допомогою пристрою для промивання планшетів видалити вміст лунок і промити планшет 4 рази робочим розчином ПР. Для цього обережно внести робочий ПР в лунки планшета до країв (рекомендується використовувати автоматичний мікропланшетний вошер в режимі перехресної аспірації і пропускати через лунку не менше 500 мкл робочого ПР), витримати 40 с, потім видалити в ємність з дезинфікуючим розчином. Видалити залишки вологи шляхом відступування по складеному в кілька шарів фільтрувальному паперу*.		
5	В усі лунки внести по 100 мкл СС або готового до застосування ТМБ-Субстратного розчину.		
6	Планшет витримати 20 хв у захищеному від світла місці при температурі від 18 до 25 °С або 15 хв при температурі $(37,0 \pm$		

	1,0)°С.
7	<p>У всі лунки внести по 150 мкл Стоп-реагенту і через 2-3 хв провести облік результатів при 450/620-680 нм. Припустимо облік результатів при одній довжині хвилі 450 нм.</p> <p>При комплектації набору готовим до застосування ТМБ-Субстратним розчином облік результатів можна проводити протягом 10 хвилин.</p>

Схема проведення ІФА наведена в Додатку.

* Для виключення неспецифічного фарбування розчину в лунках планшета з метою видалення залишків Кон'югату з поверхні Імуносорбенту, після промивання ПР допускається ополіскування Імуносорбенту дистильованою водою (заливаючи весь планшет і витрушуючи над ємністю) з подальшим видаленням залишків вологи шляхом відстукування по складеному в кілька шарів фільтрувальному паперу. Цю операцію проводити з використанням засобів індивідуального захисту (гумових рукавичок, захисних окулярів або екрана).

10.3. Проведення ІФА в автоматичному режимі:

Для постановки набору в автоматичному режимі рекомендується використовувати протокол, наданий підприємством-виробником. При самостійному створенні протоколу, він повинен відповідати п. X «Проведення аналізу», і повинні виконуватися всі вимоги, описані в п. V «Заходи безпеки».

При приготуванні робочих розчинів реагентів для автоматичної постановки необхідно враховувати «мертвий» об'єм флаконів або ємностей, що використовуються для завантаження робочих розчинів в ІФА-аналізатор.

При постановці набору на ІФА-аналізаторі для Комплектів 1 і 4 передбачається дробове використання планшета не більш ніж в трьох постановках, для Комплектів 2 і 3 не передбачається дробове використання планшета.

Протоколи постановки набору і таблиці розведення робочих розчинів реагентів для різних моделей ІФА-аналізаторів можна отримати від підприємства-виготовлювача за запитом (див. п. XIV).

Продуктивність ІФА-аналізаторів EVOLIS (BIO-RAD) і Best 2000 (Dyplex) становить 44 тесту/год при тестуванні одного планшета «ДСУ-ІФА-НВsAg» та 71 тест/год при тестуванні двох планшетів. Середній час до отримання першого результату становить 2 години 2 хв.

10.4. Спектрофотометричний контроль внесення зразків та реагентів при постановці на ІФА-аналізаторах:

- Контроль внесення зразків рекомендується проводити при довжині хвилі 450 нм, критерій: ОП > 0,125.
- Контроль внесення робочого розчину Кон'югату рекомендується проводити при довжині хвилі 620 нм, критерій: ОП > 0,400.
- Контроль внесення СС рекомендується проводити при довжині хвилі 405 нм, критерій: ОП > 0,050.

XI. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

11.1. Для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В:

Результати ІФА враховувати, якщо значення ОП в лунках з K+1 – не менше 0,600, а середнє значення ОП в лунках з K- – не більш 0,120. Якщо одне із значень ОП K - виходить за цю межу, його слід виключити з розрахунку середнього значення. Якщо виключенню підлягають більш одного значення ОП K-, аналіз слід повторити.

ОП K+2 повинна бути \geq ОПкрит.

ОПкрит. розраховують за формулою:

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

де A – коефіцієнт, що визначається методом статистичної обробки результатів постановки ІФА на підприємстві-виробнику, величину якого вказують для кожної серії в інструкції по

застосуванню, що вкладається в коробку з набором і в паспорті на серію набору реагентів.¹

¹ «Для серії № 076XXX величина коефіцієнту $A=0,050$ »

Досліджувані зразки розцінюються як негативні: якщо ОП зразка < ОПкрит.

Досліджувані зразки розцінюються як позитивні: якщо ОП зразка \geq ОПкрит.

Первиннопозитивні зразки повинні бути досліджені повторно в двох лунках для підтвердження початкового результату. Якщо при повторному дослідженні величина ОП зразка в обох лунках менше ОПкрит., зразок розцінюється як негативний. Якщо величина ОП зразка в одній з лунок дорівнює або більше ОПкрит., цей зразок повинен бути протестований у підтримуючому тесті, заснованому на реакції нейтралізації.

11.2 Для підтвердження поверхового антигену вірусу гепатиту В:

Розрахунок ОПкрит., оцінку валідності результатів ІФА з ОП К-, ОП К+1, проводити як описано в п. 11.1.

Значення ОП в лунках з К - після внесення АНТИ-НВs-МІНУС і АНТИ-НВs-ПЛЮС повинні бути нижче ОПкрит.

Наявність поверхового антигену вірусу гепатиту В (НВsAg) у досліджуваних зразках і К+1 визначається показником нейтралізації – це співвідношення значень ОП зразка після нейтралізації і значень ОП зразка до нейтралізації. Показник нейтралізації (%) визначається за формулою:

$$\frac{(\text{ОП}_k - \text{ОП}_n)}{(\text{ОП}_k - \text{ОП}_{\text{К-ср.}})} \times 100\%$$

де ОП_к – оптична густина зразка після внесення АНТИ-НВs-МІНУС;

ОП_н – оптична густина зразка після внесення АНТИ-НВs-ПЛЮС;

ОП К-ср. – середнє значення оптичної густини контрольного негативного зразка.

Показник нейтралізації ОП К+1 повинен бути 50% і більше.

Зразок вважається містить НВsAg, якщо виконуються 2 умови:

- ОП_к \geq ОПкрит.;
- Показник нейтралізації 50% і більше.

У ряді випадків у зразках з ОП $\geq 1,0$ показник нейтралізації може бути менше 50% із-за високого вмісту НВsAg. У цьому випадку зразок слід розвести робочим промивним розчином і повторити тестування (рекомендується розвести в 25, 250 разів і більше при необхідності). Зразок вважається містить НВsAg, якщо хоча б для одного з обраних розведень виконуються 2 умови:

- ОП_к \geq ОПкрит.;
- показник нейтралізації 50% і більше.

ХІІ. ОБМЕЖЕННЯ ТЕСТУ

- Висновок про реактивність зразків до НВsAg не повинен бути заснований на єдиному реактивному результаті тестування. Специфічність при отриманні позитивних результатів при скринінгу повинна бути перевірена додатковим тестуванням, наприклад, в підтверджуючому тесті.
- Негативні результати можуть бути отримані, якщо кількість поверхового антигену вірусу гепатиту В в зразку нижче рівня чутливості тесту, або якщо він відсутній на тій стадії захворювання, коли був відібраний зразок.
- Клінічний діагноз не може ґрунтуватися на результаті одного тесту, а повинен базуватися на кореляції результатів лабораторних досліджень з клінічними даними.
- Дана тест-система була розроблена і досліджена на індивідуальних сироватках (плазмах) хворих/донорів. Не можна використовувати об'єднані зразки, оскільки точність таких результатів не досліджувалася.

ХІІІ. ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ТРАНСПОРТУВАННЯ

- Термін придатності набору реагентів – 24 місяці. Умови зберігання і транспортування набору реагентів, умови і терміни зберігання робочих розчинів, невикористаних реагентів вказані в таблиці 3.
- Транспортувати набори слід критим транспортом, з дотриманням температурного режиму, встановленого виробником, у відповідності з встановленими правилами перевезень. Набори, транспортовані з порушенням температурного режиму, застосуванню не підлягають.
- Набори, що зберігалися з порушенням регламентованого режиму, застосуванню не підлягають.

Таблиця 3

13.1	Умови зберігання набору реагентів.		
	Зберігати в сухому, захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 °С протягом устанавленого терміну придатності. Заморожування не допускається. Набір реагентів з вичерпаним терміном придатності використанню не підлягає.		
13.2	Умови транспортування набору реагентів.		
	при температурі от 2 до 8 °С		
	при температурі от 9 до 25 °С	не більше 10 діб	
	при температурі от 26 до 30 °С	не більше 5 діб	
13.3	Умови та термін зберігання робочих розчинів (зберігати в чистих флаконах або спеціальній ємності, призначеної для постановки на ІФА-аналізаторах, в захищеному від світла місці)		
	Робочий ПР	при температурі от 2 до 8 °С	не більше 28 діб
		при температурі от 18 до 25 °С	не більше 14 діб
	Робочий Кон'югат	при температурі от 2 до 25 °С	не більше 12 год
	Регідратований К+2	при температурі от 2 до 8 °С	не більше 14 діб
		при температурі от 18 до 25 °С	не більше 6 год
	СС	при температурі от 2 до 25 °С	не більше 10 год
13.4	Умови і терміни зберігання невикористаних набору реагентів після розкриття.		
	Зберігати в сухому, захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 °С. Заморожування не допускається.		
	Імуносорбент	Після розкриття невикористані стрипи без рамки помістити в фольгований пакет (не видаляючи силікагель!) і ретельно герметизувати. Для цього край пакета слід звернути 2-3 рази і помістити фольгований пакет з стрипами в поліетиленовий пакет з замком Zip-Lock.	протягом терміну придатності набору реагентів
	Кон'югат, РРК, К+1, К+2(рідкий), К-, АНТИ-НВs-ПАОС, АНТИ-НВs-МІНУС, ПР, Стоп-реагент, СБ, ТМБ, ТМБ Субстратний розчин	Флакони щільно закрити гвинтовими кришками і зберігати в упаковці виробника.	протягом терміну придатності набору реагентів

ХІV. ГАРАНТІЙНІ ЗОБОВ'ЯЗАННЯ

- Виробник гарантує відповідність продукту, що випускається вимогам нормативної і технічної документації.
- Безпека і якість набору реагентів гарантуються протягом всього встановленого терміну придатності.
- Гарантії підприємства-виробника не поширюються при порушенні умов зберігання і транспортування, а також у разі недотримання інструкції по застосуванню.
- Рекламация на специфічні й фізичні властивості набору направляти на адресу підприємства-виробника – ТОВ «Діагностичні системи Україна», Україна, 04107, м. Київ, вул. Багговутівська, б. 8/10, тел. 044 361 55 76 E-mail: ua@npods.ru.

Для проведення розслідування і отримання об'єктивних висновків щодо заявленої рекламации необхідно надання:

1. рекламацийного набору,
2. зразків плазми/сироватки пацієнта,
3. протоколів досліджень із зазначенням серії набору реагентів, виробника та строків придатності.

XV. ПОЯСНЕННЯ СИМВОЛІВ

	Медичний виріб для діагностики in vitro		Термін придатності (дата закінчення терміну придатності у форматі YYYY-MM-DD)
	виробник		Зверніться до інструкцію по застосуванню
	Номер по каталогу		Температурний діапазон
	Вмісту достатньо для проведення n-кількості тестів (кількості визначень)		Не допускає впливу сонячного світла
	Код партії (номер серії)		Берегти від вологи
	Дата виготовлення (YYYY-MM)		Увага
 UA.TR.116	Знак відповідності		

СХЕМА АНАЛІЗУ

Внести	По 100 мкл К-, К+1, К+2 (К+2 вносити для комплектів 1, 2, 3)
Внести	По 100 мкл досліджуваних зразків
Внести	По 25 мкл АНТИ-НВ _s -ПЛЮС, АНТИ-НВ _s -МІНУС (виконувати тільки при використанні комплекту 4)
Внести	По 50 мкл розчину робочого Кон'югата
Інкубувати	Процедура 1: 2 години або 18 годин, $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$, термостат Процедура 2: 1 година, $(42,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$, 500 об/хв, термошейкер Процедура 3: 1 година 30 хв, $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$, 500 об/хв, термошейкер
Промити планшет	Робочий ПР, не менше 500 мкл, 4 рази
Внести	По 100 мкл СС або ТМБ-Субстратного розчину
Інкубувати	20 хв , 18 – 25 °С, в захищеному від світла місці або 15 хв , $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$, в захищеному від світла місці
Внести	По 150 мкл Стоп-реагента
Облік результатів	450 нм/620-680 нм або 450 нм