

УТВЕРЖДАЮ

Директор ЗАО

«Медицинский биологический Союз»

М.В.Лосев

«14» сентября 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«Инвитролоджик HBsAg-подтверждающий»

Набор реагентов для подтверждения выявления
поверхностного антигена HBsAg вируса гепатита В

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов «Инвитролоджик HBsAg-подтверждающий» предназначен для подтверждения специфичности выявления поверхностного антигена HBsAg вируса гепатита В в сыворотке (плазме) крови человека и препаратах, приготовленных из сыворотки (плазмы) крови человека, методом иммуноферментного «сэндвич»-анализа (ИФА) на твердофазном носителе в клинических и эпидемиологических исследованиях, а также службой крови.

1.2 Набор реагентов «Инвитролоджик HBsAg-подтверждающий» применяется одновременно с набором реагентов «Инвитролоджик HBsAg». Положительный результат, полученный при постановке анализа на наборе «Инвитролоджик HBsAg», должен быть подтвержден в реакции нейтрализации с использованием набора «Инвитролоджик HBsAg-подтверждающий».

1.3 Набор «Инвитролоджик HBsAg-подтверждающий» рассчитан на проведение 480 определений, включая контрольные образцы.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном ИФА с применением поликлональных антител к HBsAg вируса гепатита В, конъюгата моноклональных антител к HBsAg с биотином (конъюгат №1) и конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена (конъюгат №2).

Исследуемые сыворотки и контрольные образцы инкубируют с поликлональными антителами к HBsAg, сорбированными на поверхности лунок планшета, и конъюгатом №1 (Кг-1). При наличии в исследуемой сыворотке поверхностного антигена HBsAg происходит образование комплекса «антитело-антиген-конъюгат».

Комплекс «антитело-антиген-конъюгат» выявляют, добавляя в лунки планшета конъюгат №2 (Кг-2). Связавшийся Кг-2 выявляют, добавляя в лунки планшета раствор хромогена.

Реакцию останавливают стоп-реагентом. На спектрофотометре измеряют интенсивность окрашивания раствора в лунках планшета. Чем выше содержание поверхностного антигена HBsAg в сыворотке, тем интенсивнее окрашен раствор.

При одновременном внесении рабочего раствора Кг-1 и подтверждающего агента (ПА), содержащего антитела к HBsAg, происходит нейтрализация HBsAg, присутствующего в сыворотке, что приводит к уменьшению сигнала. Если степень подавления сигнала более 50 %, то исследуемую сыворотку считают положительной. В качестве контроля используется контрольный агент (КА), не содержащий антитела к HBsAg.

2.2 Состав набора приведен в таблице 1.

Таблица 1

Наименование компонента	Количество
ПА – подтверждающий агент – прозрачная фиолетового цвета жидкость	5 фл. (1,5 мл)
КА – контрольный агент – прозрачная красно-коричневого цвета жидкость	5 фл. (1,5 мл)
Инструкция по применению	1 шт.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Подтверждающий и контрольный агенты не влияют на специфичность и чувствительность тест-системы «Инвитролоджик HBsAg».

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (ГОСТ Р 51609).

4.2 При работе с набором соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.3 При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты (халат, шапочку или косынку, кожаные тапочки, одноразовые резиновые или пластиковые перчатки), т.к. контрольные образцы и исследуемые сыворотки следует рассматривать как потенциально инфицированные.

4.4 Твердые отходы, промывные растворы собирать в специальном контейнере, затем обработать дезсредствами, разрешенными в установленном порядке для применения на территории РФ, например, раствором перекиси водорода (ГОСТ 177) с массовой долей 6 % при комнатной температуре не менее 2 ч.

4.5 Инструменты и оборудование, а также поверхности, на которых проводился анализ, обработать дезсредствами, разрешенными в установленном порядке для применения на территории РФ, например, раствором этилового спирта (ГОСТ Р 51652) с объемной долей 70 % в течение нескольких секунд.

4.6 Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Устройство для промывки микропланшетов, позволяющее отбирать объемы жидкостей до 400 мкл;

- пипетка полуавтоматическая одноканальная с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей от 20 до 1000 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования с погрешностью не более 3 %;

- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(42 \pm 1)^\circ\text{C}$;

- фотометр для микропланшетов, позволяющий проводить измерение оптической плотности растворов в лунках планшетов при длинах волн 450 и 650 нм;

- набор реагентов «Инвитролоджик HBsAg»;

- цилиндр мерный второго класса точности вместимостью 1000 мл;

- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2°C до 8°C ;

- перчатки резиновые хирургические;

- бумага фильтровальная лабораторная;

- вода очищенная;

- спирт этиловый;

- водорода перекись.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Для анализа использовать сыворотку (плазму) крови человека как свежеприготовленную, так и хранившуюся не более 48 ч при температуре от 2°C до 8°C или не более трех месяцев при температуре минус 20°C .

6.2 Для проведения анализа использовать сыворотку (плазму) крови человека объемом не менее 110 мкл.

6.3 Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки готовить и хранить в условиях, исключающих возможность бактериального пророста. Необходимо осветлять сыворотки, содержащие осадок и агрегаты, путем центрифугирования в течение 15 мин при частоте вращения 3000 об/мин. Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией.

6.4 Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

6.5 Перед проведением анализа каждую исследуемую сыворотку тщательно перемешать.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Несоблюдение описанных ниже требований может привести к искажению результатов анализа:

- при проведении анализа нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов;
- для приготовления растворов использовать чистую посуду;
- время между заполнением и опорожнением лунок планшета растворами и реагентами должно быть не менее 30 с;
- не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями;
- для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами использовать одноразовые наконечники для дозаторов;
- дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать раствором спирта этилового с объемной долей 70 %, не использовать хлорамин и другие хлорсодержащие вещества;
- при использовании промывателя следить за состоянием емкости для рабочего раствора ФСБ-Т и соединительных шлангов: в них не должно быть признаков бактериального или грибкового роста.

7.1 Подготовка компонентов набора

ПА и КА готовы к использованию.

Хранение: неиспользованные ПА и КА в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С в плотно закрытых флаконах.

7.2 Проведение ИФА

Внимание!

• Время внесения контрольных образцов и исследуемых сывороток в лунки планшета-иммуносорбента не должно превышать 5-10 мин.

• Каждую сыворотку исследовать одновременно в прямом (с КА) и конкурентном (с ПА) анализе.

• При постановке ИФА на двух стрипах допускается использовать на каждом стрипе для внесения К- две лунки, для внесения К+ – одну лунку.

7.2.1 Необходимое для проведения ИФА число стрипов планшета-иммуносорбента из набора реагентов «Инвитролоджик HBsAg» вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.2 В лунки стрипов, используемых для постановки анализа с КА, внести:

- в две лунки – по 100 мкл К+;
- в две лунки – по 100 мкл К-;
- в остальные лунки – по 100 мкл исследуемых сывороток.

Затем во все лунки внести по 20 мкл КА.

7.2.3 В лунки стрипов, используемых для постановки анализа с ПА, внести:

- в две лунки – по 100 мкл К+;
- в две лунки – по 100 мкл К-;
- в остальные лунки – по 100 мкл исследуемых сывороток.

Затем во все лунки внести по 20 мкл ПА.

7.2.4 Во все лунки с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами внести по 50 мкл рабочего раствора Кг-1.

Внимание! При внесении в лунки рабочего раствора Кг-1 нельзя касаться наконечниками пипетки поверхности планшета и растворов в лунках во избежание случайного заноса исследуемых сывороток из одного стрипа в другой.

7.2.5 Затем ИФА провести в соответствии с инструкцией по применению набора «Инвитролоджик HBsAg».

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить оптическую плотность (ОП) раствора в лунках планшета-иммуносорбента на спектрофотометре в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне от 620 до 700 нм.

Допускается измерение ОП при одной длине волны – 450 нм. При этом нулевой уровень («бланк») установить по воздуху.

Время между остановкой реакции и измерением ОП должно быть не более 10 мин.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты учитывать только в том случае, если:

- среднее значение ОП в лунках с К- (ОПК-ср.) при постановке с КА менее 0,200 о.е.;
- среднее значение ОП в лунках с К+ (ОПК+ср.) при постановке с КА более 1,000 о.е.;
- среднее значение ОП в лунках с К+ (ОПК+ср.) при постановке с ПА не менее чем в 2 раза меньше, чем (ОПК+ср.) при постановке с КА.

Опкрит. рассчитать по формуле

$$\text{Опкрит.} = (\text{ОПК-ср.}) + 0,05, \quad (1)$$

где (ОПК-ср.) – среднее значение ОП в двух лунках с К- при постановке с КА.

Для каждой исследуемой сыворотки рассчитать коэффициент подавления (Кподавл.) по формуле:

$$\text{Кподавл.} = \frac{\text{ОП}_{\text{КА}} - \text{ОП}_{\text{ПА}}}{\text{ОП}_{\text{КА}} - (\text{ОП}_{\text{ПА}} - \text{ОП}_{\text{К-}})}, \quad (2)$$

где ОП_{ПА} – ОП сыворотки в лунках с ПА,

ОП_{КА} – ОП сыворотки в лунках с КА.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат считать положительным в случае, если ОП_{КА} исследуемой сыворотки больше ОПкрит. и Кподавл. более 0,5 (независимо от величины ОП_{ПА}).

Если ОП исследуемой сыворотки в прямом ИФА больше 1,5 о.е., но коэффициент подавления менее 0,5, сыворотку необходимо развести в 50 раз рабочим раствором ФСБ-Т (к 980 мкл рабочего раствора ФСБ-Т добавить 20 мкл сыворотки) и повторить анализ. Если ОП_{КА} разведенной исследуемой сыворотки больше ОПкрит. и коэффициент подавления более 0,5, то результат теста считать положительным.

Если после разведения сыворотки в 50 раз сохранится значение ОП больше 1,5 о.е. и коэффициент подавления сигнала менее 0,5, то исследуемую сыворотку развести в 100 и более раз и повторить анализ (см. Интерпретация результатов).

Во всех остальных случаях результаты теста считать отрицательными.

10 СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора 18 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Набор хранить в соответствии с СП 3.3.2.1248 при температуре от 2 °С до 8 °С в течение срока годности.

Транспортирование наборов производить в соответствии с СП 3.3.2.1248 при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре не выше 27 °С в течение 5 суток.

Замораживание наборов не допускается.

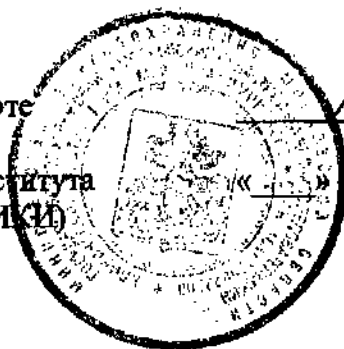
Для диагностики «in vitro».

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Отзывы о качестве наборов направлять:

- в ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора по адресу:
119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, 41;
тел./факс: 8-(499)-241-92-38;
- на предприятие-изготовитель по адресу:
630117, г. Новосибирск – 117, а/я – 113, ЗАО «МБС»;
телефоны: головной офис 8-(383)-332-52-75;
отдел продаж 8-(383)-332-81-38, 332-18-54, 339-91-97;
ОБТК 8-(38341)-5-80-98, e-mail: obtk@mbu.ru

Зам. директора по научной работе
Московского Областного
Научно-исследовательского института
им.М.Ф.Владимирского (МОНИКИ)



В.И.Шумский

200 ____ г.