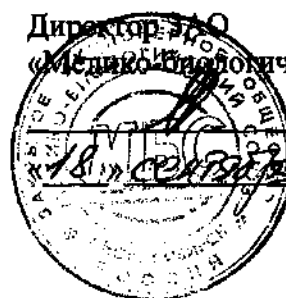


УТВЕРЖДАЮ

Директор АО
«Медико-биологический Союз»



М.В.Лосев

2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Инвитролоджик HBscoreAg-IgM»

Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител класса М
к core-антигену вируса гепатита В

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Инвитролоджик HBscoreAg-IgM» предназначен для выявления антител класса М к core-антигену вируса гепатита В (HBscoreAg) в сыворотке, плазме крови человека и препаратах, приготовленных из крови человека, методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе в клинических и эпидемиологических исследованиях, а также службой крови.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Набор реагентов рассчитан на проведение 96 или 192 определений, включая контрольные образцы.

2.2 При исследовании небольшого количества сывороток возможно проведение 12 или 24 независимых постановок ИФА по 8 анализов в каждой, включая контрольные образцы.

2.3 Принцип метода

Метод определения основан на двухстадийном твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантного core-антигена (антигена сердцевин) вируса гепатита В и моноклональных антител против IgM человека.

На первой стадии анализа исследуемые сыворотки инкубируют с иммобилизованным на поверхности лунок планшета HBscoreAg. При этом имеющиеся в сыворотке специфические антитела к HBscoreAg связываются с антигеном на твердой фазе, образуя иммунные комплексы «антиген-антитело».

На второй стадии анализа комплексы «антиген-антитело» выявляют с помощью конъюгата моноклональных антител против IgM человека с пероксидазой хрена.

После отмывки несвязавшихся компонентов конъюгата выявляют комплекс «антиген-антитело-конъюгат», добавляя в лунки планшета раствор хромогена, содержащий перекись водорода и тетраметилбензидин.

Реакцию останавливают стоп-реагентом. На спектрофотометре измеряют интенсивность окрашивания раствора в лунках иммуносорбента. Чем выше содержание антител класса М к HBscoreAg в сыворотке, тем интенсивнее окрашен раствор.

2.4 Набор реагентов выпускают в виде трех комплектов:

- комплект 1 для ручной постановки – на 96 определений;
- комплект 2 для ручной постановки – на 192 определения;
- комплект 3 для ручной постановки и автоматического анализатора – на 96 определений.

2.5 Состав комплектов приведен в таблице 1.

Таблица 1

Наименование компонента	Комплект 1		Комплект 2	Комплект 3		
Иммунсорбент – рекомбинантный соге-антиген вируса гепатита В, сорбированный в лунках планшетов	разборный, 1 шт.	разделяемый по лункам, 1 шт.	разборный, 2 шт.	разборный, 1 шт.	разборный, 2 шт.	монолитный, 2 шт.
К+ – инактивированный контрольный положительный образец – прозрачная малинового цвета жидкость	1 фл. (2 мл)	1 фл. (2 мл)	2 фл. (2 мл)	1 фл. (2 мл)	1 фл. (4 мл) или 2 фл. (2 мл)	1 фл. (4 мл) или 2 фл. (2 мл)
К- – инактивированный контрольный отрицательный образец – прозрачная желтого цвета жидкость	1 фл. (3 мл)	1 фл. (3 мл)	2 фл. (3 мл)	1 фл. (3 мл)	1 фл. (6 мл) или 2 фл. (3 мл)	1 фл. (6 мл) или 2 фл. (3 мл)
РК – раствор конъюгата – прозрачная зеленого цвета жидкость	1 фл. (6 мл)	1 фл. (6 мл)	2 фл. (6 мл)	1 фл. (9 мл) или 2 фл. (6 мл)	4 фл. (6 мл) или 2 фл. (9 мл) или 1 фл. (18 мл)	4 фл. (6 мл) или 2 фл. (9 мл) или 1 фл. (18 мл)
РХ – раствор хромогена – прозрачная розового цвета жидкость	1 фл. (13 мл)	1 фл. (13 мл)	2 фл. (13 мл)	1 фл. (20 мл) или 2 фл. (13 мл)	2 фл. (20 мл) или 4 фл. (13 мл)	2 фл. (20 мл) или 4 фл. (13 мл)
ФСБ-Т(х25) – 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (26 мл)	1 фл. (26 мл)	2 фл. (26 мл)	1 фл. (50 мл) или 2 фл. (26 мл)	1 фл. (75 мл) или 2 фл. (50 мл)	1 фл. (75 мл) или 2 фл. (50 мл)
Стоп-реагент – 0,9 моль/л раствор кислоты серной – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (6 мл)	1 фл. (6 мл)	1 фл. (12 мл)	1 фл. (12 мл)	1 фл. (20 мл) или 2 фл. (12 мл)	1 фл. (20 мл) или 2 фл. (12 мл)
Инструкция по применению	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.

Дополнительно в комплект вкладывают клейкую пленку для планшета, пластиковые емкости для растворов, одноразовые наконечники для дозаторов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Подлинность. Набор должен выявлять суммарные антитела к соге-антигену вируса гепатита В в положительных сыворотках рабочей панели «РП-АТ(+/-)HBcoreAg», аттестованной ОБТК предприятия, и не давать ложноположительных результатов при исследовании сывороток этой же панели, не содержащих антитела к HBcoreAg.

3.2 Чувствительность. Степень способности набора выявлять положительные сыворотки рабочей панели «РП-АТ(+/-)HBcoreAg» методом ИФА без ложноотрицательных результатов – 100 %.

3.2 Специфичность. Степень способности набора выявлять отрицательные сыворотки рабочей панели «РП-АТ(+/-)HBcoreAg» методом ИФА без ложноположительных результатов – 100 %.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609).

4.2 При работе с набором следует 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 Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. При попадании стоп-реагента на кожу и слизистые промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.4 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.

4.5 Твердые отходы, промывные растворы собирать в специальном контейнере, затем обработать дезсредствами, разрешенными для применения на территории РФ, например, раствором перекиси водорода (ТУ 2123-002-57856778) с массовой долей 6 % при комнатной температуре не менее 2 ч.

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

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Устройство для промывки микропланшетов или восьмиканальная полуавтоматическая пипетка со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей до 300 мкл;

- пипетка полуавтоматическая одноканальная с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей от 10 до 200 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования с погрешностью не более 3 %;

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

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

- цилиндр мерный второго класса точности вместимостью 1000 мл;

- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от $2 ^\circ\text{C}$ до $8 ^\circ\text{C}$;

- бумага фильтровальная лабораторная;

- вода очищенная;

- спирт этиловый;

- водорода перекись;

- перчатки резиновые.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Для определения суммарных антител к HbcoreAg использовать сыворотку (плазму) крови человека как свежеприготовленную, так и хранившуюся не более 48 ч при температуре от $2 ^\circ\text{C}$ до $8 ^\circ\text{C}$ или не более трех месяцев при температуре минус $20 ^\circ\text{C}$.

6.2 Для проведения анализа использовать сыворотку (плазму) крови человека объемом не менее 60 мкл.

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

6.4 Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

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;

- в процессе промывки полностью заполнять лунки планшета без переполнения и перетекания жидкости в соседние лунки;
- 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

Внимание!

•Комплект перед проведением анализа выдержать в течение 30 мин при температуре от 17 °С до 27 °С.

•Содержимое флаконов с реагентами, входящими в состав набора, и исследуемые сыворотки перед проведением анализа тщательно перемешать.

•Для отбора исследуемых проб и реагентов использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объема не более 3 %.

7.1.1 Подготовка иммуносорбента

Иммуносорбент готов к использованию.

Хранение: неиспользованные стрипы в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 месяцев.

7.1.2 Приготовление рабочего раствора ФСБ-Т (для промывки планшетов)

При наличии осадка флакон с ФСБ-Т(х25) выдержать при температуре 37 °С до полного растворения солей.

Содержимое одного флакона с ФСБ-Т(х25) перенести в мерный цилиндр и довести объем раствора до 650 мл водой очищенной.

В случае использования одного или нескольких стрипов планшета в мерный цилиндр отобрать необходимые объемы ФСБ-Т(х25) и воды очищенной в соответствии с таблицей 2.

Т а б л и ц а 2

Объем, мл	Количество используемых стрипов, шт.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т(х25)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Вода очищенная	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
РК	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
РХ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Стоп-реагент	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0

Хранение: неиспользованный ФСБ-Т(х25) в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.3 Подготовка РК и РХ

РК и РХ готовы к использованию.

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

7.1.4 Подготовка контрольных образцов

К+ и К- готовы к использованию.

Хранение: неиспользованные К+ и К- в закрытых флаконах в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.5 Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: неиспользованный стоп-реагент в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.2 Проведение ИФА

7.2.1 Проведение ИФА при ручной постановке (комплект 1, комплект 2, комплект 3)

7.2.1.1 Необходимое количество стрипов вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.1.2 Приготовить рабочий раствор ФСБ-Т (приготовление см. 7.1.2), вскрыть флаконы с контрольными образцами.

7.2.1.3 В любые две лунки планшета внести по 50 мкл K+, в три другие лунки – по 50 мкл K-, в остальные – по 50 мкл исследуемых сывороток.

При постановке ИФА на одном или двух стрипах допускается использовать для K- две лунки, для K+ – одну лунку.

Внимание! Время внесения контрольных образцов и исследуемых сывороток не должно превышать 5-10 мин.

7.2.1.4 Во все лунки планшета добавить по 50 мкл РК (необходимое количество РК перед внесением перелить из флакона в прилагаемую к набору пластиковую емкость).

При необходимости допускается проведение оптического контроля точности внесения РК, контрольных образцов и исследуемых сывороток (см. 7.3.1).

Содержимое лунок перемешать осторожным постукиванием по краю планшета.

Планшет заклеить клейкой пленкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре 37 °С.

7.2.1.5 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет пять раз рабочим раствором ФСБ-Т. Для этого внести в каждую лунку планшета от 250 до 300 мкл раствора, а затем удалить содержимое лунок в емкость с дезраствором. Остатки раствора удалить, активно постукивая перевернутым (лунками вниз) планшетом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

7.2.1.6 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл РХ (необходимое количество РХ перед внесением перелить из флакона в прилагаемую к набору пластиковую емкость).

Планшет заклеить клейкой пленкой и поместить на 10 мин в защищенное от света место при температуре 37 °С.

При необходимости допускается проведение оптического контроля точности внесения РХ (см. 7.3.2).

7.2.1.7 Остановить реакцию внесением в каждую лунку планшета по 50 мкл стоп-реагента.

7.2.2 Проведение ИФА на автоматическом анализаторе (комплект 3)

7.2.2.1 Залить рабочий раствор ФСБ-Т в предназначенную для него емкость анализатора (приготовление см. 7.1.2).

7.2.2.2 Залить остальные рабочие растворы, реагенты, K+, K- и анализируемые сыворотки в специальные контейнеры.

7.2.2.3 Поместить в анализатор планшет-иммуносорбент.

7.2.2.4 Задать программу проведения ИФА:

Внесение растворов	Полный планшет 2 лунки – по 50 мкл K+; 3 лунки – по 50 мкл K-; остальные лунки – по 50 мкл исследуемых сывороток; все лунки – по 50 мкл РК	Постриповая постановка 1 лунка – 50 мкл K+; 2 лунки – по 50 мкл K-; остальные лунки – по 50 мкл исследуемых сывороток; все лунки – по 50 мкл РК
	Инкубация	60 мин при температуре 37 °С
Промывка	5 раз рабочим раствором ФСБ-Т объемом от 250 до 300 мкл	
Внесение раствора	все лунки – по 100 мкл РХ	
Инкубация	10 мин в защищенном от света месте при температуре 37 °С	
Внесение раствора	все лунки – по 50 мкл стоп-реагента	

7.2.2.5 Провести разметку лунок планшета в схеме анализатора.

7.2.2.6 Включить анализатор.

7.3 Оптический контроль точности внесения реагентов в планшеты

7.3.1 Оптическая плотность (ОП) растворов в лунках, содержащих РК, контрольные образцы и исследуемые сыворотки, должна быть более 0,150 о.е. при длине волны 450 нм.

7.3.2 Оптическая плотность раствора в лунке после внесения РК должна быть более 0,080 о.е. при длине волны 490 нм.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину ОП растворов в лунках планшета 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 40 мин.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты учитывать только в том случае, если:

- среднее значение ОП в лунках с К+ (ОПК+ср.) менее 0,200 о.е;
- среднее значение ОП в лунках с К- (ОПК-ср.) более 0,800 о.е.

ОПкрит. рассчитать по формуле

$$\text{ОПкрит.} = (\text{ОПК-ср.}) / 2 - 0,200, \quad (1)$$

где (ОПК-ср.) – среднее значение (ОПК-) по трем (двум) лункам.

Для каждой исследуемой сыворотки рассчитать коэффициент позитивности (КП) по формуле

$$\text{КП} = \text{ОП исследуемой сыворотки} / \text{ОПкрит.} \quad (2)$$

Результаты теста считать положительными (в сыворотке присутствуют антитела к HBcoreAg), если КП исследуемого образца менее 1,0.

Остальные результаты теста считать отрицательными (в сыворотке отсутствуют антитела к HBcoreAg).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПО РАЗЛИЧНЫМ МАРКЕРАМ ГЕПАТИТА В

HBsAg	HBeAg	Суммарные антитела против HBeAg	IgM против HBcoreAg	Суммарные антитела против HBcoreAg	Суммарные антитела против HBsAg	Интерпретация
+	+	–	–	–	–	Инкубационный период
+	+	–	+	+	–	Острый гепатит В или носительство
+	+	–	–	+	–	Носительство
+	–	+	+/-	+	–	Носительство
–	–	+	+/-	+	+	Начало или продолжение выздоровления
–	–	–	–	+	+	Окончательное выздоровление
–	–	–	+	+	–	Заражение вирусом гепатита В без выявляемого HBsAg
–	–	–	–	+	–	Окончательное выздоровление с отсутствием выявляемых антител против HBsAg
–	–	–	–	–	+	Иммунизация без заражения, повторный контакт с антигеном без заражения или полное выздоровление при отсутствии выявляемых антител против HBcoreAg

10 СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора 12 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 лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.
Для диагностики «in vitro».

Отзывы о качестве наборов направлять:

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

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



ПРОШКУРОВАНО И ПРОБРОШКУРОВАНО
7 ЛИСТОВ

Директор ЗАО "МБС" Лосев М.В.

