

УТВЕРЖДАЮ

Директор ЗАО

«Медико-биологический Союз»

М.В.Лосев

«14» сентября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«Инвитролоджик НВeAg»

Набор реагентов для иммуноферментного выявления
е-антигена вируса гепатита В

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Инвитролоджик НВeAg» предназначен для выявления е-антигена вируса гепатита В (НВeAg) в сыворотке, плазме крови человека и препаратах, приготовленных из крови человека, методом 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 определений, включая контрольные образцы.

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

2.3 Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном твердофазном ИФА с применением моноклональных антител к НВeAg, сорбированных на поверхности лунок иммуносорбента, и моноклональных антител к НВeAg, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Исследуемые сыворотки и рабочий раствор конъюгата инкубируют с иммобилизованными на поверхности лунок планшета антителами к НВeAg. При наличии в исследуемой сыворотке НВeAg образуются комплексы «антитело-антиген-конъюгат».

После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и конъюгата образовавшиеся комплексы выявляют, добавляя в лунки планшета раствор хромогена. При этом в лунках, содержащих НВeAg, происходит изменение окраски раствора. В лунках, не содержащих НВeAg, изменение окраски раствора не произойдет.

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

2.4 Набор реагентов выпускают в виде следующих комплектов:

- комплект 1 для ручной постановки – на 96 определений;
- 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 3
Иммуносорбент – моноклональные антитела к НВeAg, сорбированные в лунках разборных планшетов	1 шт.	1 шт.
К+ – положительный контрольный образец, инактивированный – прозрачная малинового цвета жидкость	1 фл. (2,0 мл)	1 фл. (2,0 мл)
К- – отрицательный контрольный образец, инактивированный – прозрачная желтого цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)
РБР-К – разводящий буферный раствор для конъюгата – прозрачная красно-коричневого цвета жидкость	1 фл. (6,0 мл)	1 фл. (12,0 мл) или 2 фл. (6,0 мл)

КГ – конъюгат – прозрачная зеленого цвета жидкость	1 фл. (0,75 мл)	1 фл. (1,5 мл) или 2 фл. (0,75 мл)
РХ – раствор хромогена – прозрачная розового цвета жидкость	1 фл. (13,0 мл)	1 фл. (20,0 мл) или 2 фл. (13,0 мл)
ФСБ-Т(х25) – 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (26,0 мл)	1 фл. (50,0 мл) или 2 фл. (26,0 мл)
стоп-реагент – 0,9 моль/л раствор кислоты серной – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (6,0 мл)	1 фл. (12,0 мл)
инструкция по применению	1 шт.	1 шт.

Дополнительно в комплект вкладывают клейкую пленку для планшета, ванночки для реагентов, одноразовые наконечники для дозаторов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Подлинность. Набор реагентов должен выявлять HBeAg в положительных сыворотках рабочей панели «РП(+/-)HBeAg», аттестованной ОБТК предприятия, и не давать ложноположительных результатов при исследовании сывороток этой же панели, не содержащих HBeAg.

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

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

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2 При работе с набором реагентов соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического 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 реагентов, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Серная кислота, входящая в состав стоп-реагента, 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 (ГОСТ 177) с массовой долей 6 % не менее 2 ч при температуре от 17 °С до 27 °С.

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 40 до 200 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования с погрешностью не более 3 %;

- термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;

- - фотометр для микропланшетов, позволяющий проводить измерение оптической плотности растворов в лунках планшетов при длинах волн 450 и 650 нм;
- анализатор автоматический открытого типа;
- цилиндр мерный второго класса точности вместимостью 1000 мл;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 °С до 8 °С;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- вода очищенная;
- спирт этиловый;
- водорода перекись;
- перчатки резиновые.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2 Для проведения анализа использовать сыворотку, плазму крови человека объемом 50 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 сывороток.

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;
- в процессе промывки полностью заполнять лунки иммуносорбента без переполнения и перетекания жидкости в соседние лунки;
- не допускать высыхания лунок иммуносорбента между отдельными операциями;
- для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами использовать одноразовые наконечники для дозаторов;
- пипетки 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

Перед проведением анализа выдержать набор в течение 30 мин при температуре от 17 °С до 27 °С.

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

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

Содержимое флакона с ФСБ-Т(х25) перенести в мерный цилиндр, разбавить в 25 раз водой очищенной и тщательно перемешать.

При постановке ИФА на отдельных стрипах в мерный цилиндр отобрать необходимые объемы ФСБ-Т(х25) и воды очищенной в соответствии с таблицей 2.

Объем, мл	Количество используемых стрипов, шт.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
комплект 1												
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
РБР-К	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
Кг	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6
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
комплект 3												
ФСБ-Т(х25)	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0	24,0	28,0	32,0	36,0	40,0	44,0	48,0
Вода очищенная	до 100	до 200	до 300	до 400	до 500	до 600	до 700	до 800	до 900	до 1000	до 1100	до 1200
РБР-К	1,0	1,5	2,5	3	4	4,5	5,5	6	7	7,5	8,5	9
Кг	0,1	0,15	0,25	0,3	0,4	0,45	0,55	0,6	0,7	0,75	0,85	0,9
РХ	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Стоп-реагент	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

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

7.1.3 Подготовка РБР-К и РХ

РБР-К и РХ готовы к использованию.

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

7.1.4 Подготовка рабочего раствора Кг

Из флакона с Кг отобрать указанный на этикетке объем (V – объем Кг в мл) и перенести во флакон с РБР-К. Рабочий раствор Кг тщательно перемешать, не допуская образования пены.

При постановке ИФА на отдельных стрипах в чистый флакон отобрать необходимые объемы РБР-К и Кг в соответствии с таблицей 2.

Хранение: рабочий раствор Кг не более 10 мин при температуре от 17 °С до 27 °С, неиспользованный Кг в закрытом флаконе в течение срока годности набора реагентов при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.5 Подготовка контрольных образцов

К+ и К- готовы к использованию.

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

7.1.6 Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию.

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

7.2 Проведение ИФА

7.2.1 Проведение ИФА при ручной постановке (комплект 1, 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, рабочий раствор Кг, вскрыть флаконы с остальными реагентами и контрольными образцами.

7.2.1.3 Во все лунки иммуносорбента, предназначенные для постановки анализа, внести по 50 мкл рабочего раствора Кг.

7.2.1.4 Затем в одну лунку внести 50 мкл К+, в две другие лунки – по 50 мкл К-, в остальные – по 50 мкл исследуемых сывороток.

Раствор перемешать пять раз пипетированием, при этом цвет рабочего раствора Кг должен измениться.

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

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

Иммуносорбент 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 иммуносорбент пять раз рабочим раствором ФСБ-Т. Для этого внести в каждую лунку иммуносорбента от 250 до 300 мкл раствора, а затем удалить содержимое лунок в емкость с дезраствором. Остатки раствора удалить, активно постукивая перевернутым (лунками вниз) иммуносорбентом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

7.2.1.6 Внести в каждую лунку иммуносорбента по 100 мкл РХ.

Необходимое количество РХ перед внесением перелить из флакона в прилагаемую к набору пластиковую емкость.

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и поместить на 20 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 иммуносорбента 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.

7.2.2.2 Залить остальные рабочие растворы, реагенты, контрольные образцы и анализируемые сыворотки в специальные контейнеры.

7.2.2.3 Поместить в анализатор иммуносорбент.

7.2.2.4 Задать программу проведения ИФА:

Внесение растворов	все лунки – по 50 мкл рабочего раствора Кг; 1 лунка – 50 мкл К+; 2 лунки – по 50 мкл К-; остальные лунки – по 50 мкл исследуемых сывороток
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	20 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 иммуносорбента в схеме анализатора.

7.2.2.6 Включить анализатор.

7.3 Оптический контроль точности внесения реагентов в лунки иммуносорбента

7.3.1 Оптическая плотность (ОП) растворов в лунках, содержащих рабочий раствор Кг и контрольные образцы, рабочий раствор Кг и исследуемые сыворотки, должна быть более 0,120 о.е. при длине волны 450 нм.

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

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину ОП растворов в лунках 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 40 мин.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты учитывать только в том случае, если:

- 1) значение ОП в лунке с К+ (ОПК+) более 0,400 о.е.;
- 2) среднее значение ОП в лунках с К- (ОПК-ср.) менее 0,200 о.е.

ОПкрит. рассчитать по формуле

$$\text{ОПкрит.} = (\text{ОПК-ср.}) + 0,150, \quad (1)$$

где (ОПК-ср.) – среднее значение ОП (ОПК-) по 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 присутствует НВеАg), если КП исследуемой сыворотки более 1,0.

Остальные результаты теста считать отрицательными (в сыворотке отсутствует НВеАg).

Для подтверждения положительного результата анализа рекомендуется эту же сыворотку исследовать повторно в данном наборе реагентов. Повторное получение положительного результата свидетельствует о том, что в сыворотке, плазме присутствует НВеАg.

Если при повторной постановке ИФА получен отрицательный результат, то данную сыворотку считать сомнительной и передать для дальнейшего изучения другими методами.

10 СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора реагентов 12 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Набор реагентов хранить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 °С до 8 °С в течение срока годности.

Транспортирование наборов реагентов производить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре не выше 27 °С в течение 5 суток.

Замораживание наборов реагентов не допускается.

Для диагностики «in vitro».

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Отзывы о качестве наборов реагентов 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;
- 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 института
им.М.Ф.Владимирского (МОНИКИ)



В.И.Шумский

сентябрь 2008 г.

Прошнуровано и
проброшнуровано
6 листов

Директор ЗНД МБС
Посев М.В.

