

УТВЕРЖДЕНА

УТВЕРЖДАЮ

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201__ г. № _____



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «Инвитролоджик HBsAg-стрип-подтверждающий» для иммуноферментного подтверждения выявления поверхностного антигена HBsAg вируса гепатита В

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Подтверждение выявления поверхностного антигена HBsAg вируса гепатита В в сыворотке, плазме крови человека и препаратах, приготовленных из крови человека, в клинических и эпидемиологических исследованиях, а также службой крови.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном «сэндвич»-анализе (ИФА) с применением поликлональных антител к HBsAg вируса гепатита В, конъюгата моноклональных антител к HBsAg с биотином (входит в состав ПА и КА) и конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена (конъюгат №2). Подтверждение наличия поверхностного антигена в исследуемом образце основано на реакции нейтрализации HBsAg специфическими антителами, содержащимися в ПА.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют с поликлональными антителами к HBsAg, сорбированными на поверхности лунок иммуносорбента, и конъюгатом моноклональных антител к HBsAg с биотином. При наличии в исследуемом образце поверхностного антигена HBsAg в лунках с КА происходит образование комплекса «антитело-антиген-конъюгат», а в лунках с ПА происходит образование комплекса «антитело-антиген-антитело», что, в конечном итоге, приводит к уменьшению сигнала при внесении ТМБ в лунку.

После удаления несвязавшихся компонентов КА, ПА и исследуемого образца в лунки иммуносорбента добавляют конъюгат №2, который выявляет комплекс «антитело-антиген-конъюгат».

Связавшийся конъюгат №2 выявляют, добавляя в лунки иммуносорбента раствор хромогена.

Реакцию останавливают стоп-реагентом. На спектрофотометре измеряют интенсивность окрашивания раствора в лунках иммуносорбента.

Интенсивность окрашивания раствора в лунках с КА пропорциональна содержанию поверхностного антигена HBsAg вируса гепатита В в исследуемом образце. При измерении оптическая плотность (ОП) раствора в лунках с ПА должна составлять 50 % и менее от ОП в лунках с КА.

2.2 Состав комплектов

Наименование компонента	Комплект 1	Комплект 2
иммуносорбент – поликлональные антитела против HBsAg вируса гепатита В, сорбированные в лунках разборных планшетов	1 шт.	2 шт.

К+ – инактивированный положительный контрольный образец – прозрачная красного цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)
К- – инактивированный отрицательный контрольный образец – желтого цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)
Кг-2 – конъюгат №2 – опалесцирующая бесцветная жидкость	1 фл. (0,75 мл)	1 фл. (1,5 мл)
КА – контрольный агент – опалесцирующая бесцветная жидкость	1 фл. (0,4 мл)	1 фл. (0,8 мл)
ПА – подтверждающий агент – прозрачная черного цвета жидкость	1 фл. (0,4 мл)	1 фл. (0,8 мл)
РДР – раствор для разведения – прозрачная синего цвета жидкость	1 фл. (6,0 мл)	1 фл. (12,0 мл)
РРК-2 – раствор для разведения конъюгата №2 – прозрачная оранжево-красного цвета жидкость	1 фл. (6,0 мл)	2 фл. (6,0 мл)
БРС – буферный раствор субстрата – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13,0 мл)	2 фл. (13,0 мл)
ТМБ – тетраметилбензидин – прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость	1 фл. (0,5 мл)	1 фл. (1,0 мл)
ФСБ-Т(х25) – 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (28,0 мл)	2 фл. (28,0 мл)
стоп-реагент – прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (6,0 мл)	1 фл. (12,0 мл)
инструкция по применению	1 шт.	1 шт.

Дополнительно в набор реагентов вкладывают: клейкую пленку для планшета, ванночки для разведения реагентов, одноразовые наконечники для дозаторов.

2.3 Набор реагентов «Инвитролоджик HBsAg-стрип-подтверждающий» в зависимости от комплектации рассчитан на проведение 48 или 96 определений, включая контрольные образцы.

2.4 При исследовании небольшого количества сывороток возможно проведение 6 или 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов в каждой, включая контрольные образцы.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Чувствительность по «ДС-СО-HBsAg» при проведении анализа по процедуре 1 составляет 0,05 МЕ/мл.

3.2 Чувствительность по «ДС-СО-HBsAg» при проведении анализа по процедуре 2 составляет 0,01 МЕ/мл.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 3 (ГОСТ Р 51609).

4.2 При работе с набором реагентов 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 реагентов, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Серная кислота, входящая в состав стоп-реагента, обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания стоп-реагента на кожу и слизистые. В случае попадания 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 и исследуемые образцы следует рассматривать как потенциально инфицированные.

4.5 Твердые отходы, промывные растворы собирать в специальном контейнере, затем обработать дезсредствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке, например, раствором перекиси водорода (ТУ 2123-002-57856778) с массовой долей 6 % при температуре от 17 °С до 27 °С не менее 2 ч.

4.6 Инструменты и оборудование, а также поверхности, на которых проводился анализ, обработать дезсредствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке, 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 400 мкл;

- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования с погрешностью измерения не более 3 %;

- термостат или термостатирующий шейкер, поддерживающие температуру $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ или $(42 \pm 1) ^\circ\text{C}$;

- фотометр для микропланшетов, позволяющий проводить измерение оптической плотности растворов в лунках планшетов в диапазоне от 450 до 700 нм;

- цилиндр мерный второго класса точности вместимостью 1000 мл;

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

- перчатки резиновые хирургические;

- бумага фильтровальная лабораторная;

- вода очищенная;

- спирт этиловый;

- водорода перекись.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Для проведения анализа использовать сыворотку, плазму крови человека и препараты, приготовленные из крови человека (по тексту – образцы), объемом 220 мкл.

6.2 Для анализа использовать образцы как свежеприготовленные, так и хранившиеся не более 7 суток при температуре от $2 ^\circ\text{C}$ до $8 ^\circ\text{C}$ или не более 6 месяцев при температуре минус $20 ^\circ\text{C}$.

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.

6.5 Перед проведением анализа каждый исследуемый образец тщательно перемешать.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Несоблюдение описанных ниже требований может привести к искажению результатов анализа:

- при проведении анализа нельзя использовать реагенты из наборов реагентов «Инвитролоджик HBsAg-стрип-подтверждающий» разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, за исключением РДР и РРК-2, которые являются универсальными для всех наборов реагентов «Инвитролоджик HBsAg-стрип-подтверждающий»;

- при проведении анализа возможно использование ФСБ-Т(х25) и стоп-реагента из любых других наборов реагентов производства ЗАО «МБС», т.к. они являются универсальными для всех наборов реагентов;

- для приготовления растворов использовать чистую посуду;

- время между заполнением и опорожнением лунок иммуносорбента растворами и реагентами должно быть не менее 30 с;

- не допускать высыхания лунок иммуносорбента между отдельными операциями;

- для работы с исследуемыми 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

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

Т а б л и ц а 1 – Расход компонентов набора реагентов для проведения анализа на одном планшете

Компонент		Количество используемых стрипов, шт.					
		2	4	6	8	10	12
Объем, мл	ФСБ-Т(х25)	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0	24,0
	Вода очищенная	до 100	до 200	до 300	до 400	до 500	до 600
	РДР (для КА)	1,0	2,0	3,0	-	-	-
	РДР (для ПА)	1,0	2,0	3,0	-	-	-
	КА	0,1	0,2	0,3	-	-	-
	ПА	0,1	0,2	0,3	-	-	-
	РРК-2	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
	Кг-2	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
	БРС	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	13,0
	ТМБ	0,06	0,12	0,18	0,24	0,3	0,4

7.1.1 Подготовка иммуносорбента

Иммуносорбент готов к использованию.

Хранение: неиспользованные стрипы иммуносорбента 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

• Рабочий раствор ФСБ-Т готовить за 15 мин до проведения анализа.

• При выпадении осадка прогреть флакон с ФСБ-Т(х25) при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

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

При проведении анализа на отдельных стрипах иммуносорбента в мерный цилиндр отобрать необходимые объемы ФСБ-Т(х25) и воды очищенной в соответствии с таблицей 1.

Хранение: рабочий раствор ФСБ-Т не более 12 ч при температуре от 17 °С до 27 °С или не более 7 суток при температуре от 2 °С до 8 °С, неиспользованный ФСБ-Т(х25) - в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.3 Подготовка РДР, РРК-2, БРС

РДР, РРК-2, БРС готовы к использованию.

Хранение: неиспользованные РДР, РРК-2, БРС в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С в плотно закрытых флаконах.

7.1.4 Подготовка контрольных образцов

К+ и К- готовы к использованию.

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

7.1.5 Приготовление рабочих растворов КА и ПА

Внимание! Рабочие растворы КА и ПА готовить за 15 мин до использования.

Из флакона с РДР отобрать 3 мл раствора и перенести в чистый флакон. Из флакона с КА отобрать указанный на этикетке объем (V в мл) раствора и перенести во флакон с отобранном объемом РДР. Раствор тщательно перемешать, не допуская образования пены.

Из флакона с ПА отобрать указанный на этикетке объем (V в мл) раствора и перенести во флакон с оставшимися объемом (3 мл) РДР. Раствор тщательно перемешать, не допуская

образования пены.

При постановке анализа на отдельных стрипах иммуносорбента объемы РДР, КА и ПА, необходимые для проведения ИФА, отобрать согласно таблице 1.

Хранение: рабочие растворы КА и ПА не более 15 мин при температуре от 17 °С до 27 °С, неиспользованные КА и ПА в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С в плотно закрытых флаконах.

7.1.6 Приготовление рабочего раствора Кг-2

Внимание! Рабочий раствор Кг-2 готовить за 15 мин до использования.

Из флакона с Кг-2 отобрать указанный на этикетке объем (*V* в мл) раствора и перенести во флакон с РРК-2. Раствор тщательно перемешать, не допуская образования пены.

При постановке анализа на отдельных стрипах иммуносорбента в чистый флакон отобрать необходимые объемы РРК-2 и Кг-2 (см. таблицу 1).

Хранение: рабочий раствор Кг-2 не более 15 мин при температуре от 17 °С до 27 °С, неиспользованный Кг-2 в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.7 Приготовление рабочего раствора ТМБ

Внимание! Рабочий раствор ТМБ готовить непосредственно перед использованием.

Из флакона с ТМБ отобрать указанный на этикетке объем (*V* в мл) раствора и перенести во флакон с БРС. Раствор тщательно перемешать.

При постановке анализа на отдельных стрипах иммуносорбента в чистый флакон отобрать необходимые объемы БРС и ТМБ (см. таблицу 1).

Хранение: рабочий раствор ТМБ не более 3 ч при температуре 17 °С до 27 °С в защищенном от света месте, неиспользованный ТМБ в закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте.

7.1.8 Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию.

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

7.2 Проведение ИФА

- Каждый образец *одновременно* исследовать в прямом и конкурентном ИФА.
- Один стрип использовать для постановки прямого ИФА, другой – для постановки конкурентного ИФА.
- При постановке ИФА на двух стрипах допускается использовать для внесения К- две лунки, для внесения К+ – одну лунку.
- Время внесения контрольных и исследуемых образцов в лунки иммуносорбента не должно превышать 10 мин.
- При внесении в лунки рабочих растворов КА, ПА и Кг-2 нельзя касаться наконечником пипетки поверхности иммуносорбента и раствора, находящегося в лунках, во избежание случайного заноса образца из одного стрипа в другой через наконечники.
- Для получения чувствительности 0,05 МЕ/мл использовать процедуру 1. Для получения чувствительности 0,01 МЕ/мл использовать процедуру 2. Для сокращения времени проведения ИФА рекомендуется использовать температуру инкубации 42 °С.

7.2.1 Проведение ИФА по процедуре 1 при температуре 42 °С

7.2.1.1 Необходимое для проведения анализа число стрипов иммуносорбента вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.1.2 В лунки, предназначенные для контрольных образцов при проведении прямого и конкурентного ИФА, внести:

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

Во все лунки иммуносорбента, используемые для проведения прямого ИФА, внести по 100 мкл исследуемых образцов. Затем в лунки с контрольными и исследуемыми образцами внести по 50 мкл рабочего раствора КА (см. приготовление 7.1.5).

Во все лунки иммуносорбента, используемые для проведения конкурентного ИФА, внести

по 100 мкл исследуемых образцов. Затем в лунки с контрольными и исследуемыми образцами внести по 50 мкл рабочего раствора ПА (см. приготовление 7.1.5).

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в термостатирующем шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин в течение 20 мин при температуре 42 °С.

7.2.1.3 Внести в каждую лунку по 50 мкл рабочего раствора Кг-2 (см. приготовление 7.1.6).

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в термостатирующем шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин в течение 10 мин при температуре 42 °С.

7.2.1.4 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть иммуносорбент пять раз рабочим раствором ФСБ-Т. Для этого внести в каждую лунку не менее 380 мкл рабочего раствора ФСБ-Т, а затем удалить содержимое лунок в емкость с дезраствором. При использовании устройства для промывки микропланшетов рекомендуется использовать режим отмывки с переполнением «Overflow» (с внесением в лунки иммуносорбента от 600 до 700 мкл рабочего раствора ФСБ-Т).

Остатки раствора из лунок удалить, активно постукивая перевернутым (лунками вниз) иммуносорбентом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

7.2.1.5 Внести в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (см. приготовление 7.1.7).

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при температуре 37 °С.

7.2.1.6 Остановить реакцию внесением в каждую лунку иммуносорбента по 50 мкл стоп-реагента.

7.2.2 Проведение ИФА по процедуре 1 при температуре 37 °С

7.2.2.1 Необходимое для проведения анализа число стрипов иммуносорбента вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.2.2 В лунки, предназначенные для контрольных образцов при проведении прямого и конкурентного ИФА, внести:

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

Во все лунки иммуносорбента, используемые для проведения прямого ИФА, внести по 100 мкл исследуемых образцов. Затем в лунки с контрольными и исследуемыми образцами внести по 50 мкл рабочего раствора КА (см. приготовление 7.1.5).

Во все лунки иммуносорбента, используемые для проведения конкурентного ИФА, внести по 100 мкл исследуемых образцов. Затем в лунки с контрольными и исследуемыми образцами внести по 50 мкл рабочего раствора ПА (см. приготовление 7.1.5).

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в термостатирующем шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин в течение 30 мин при температуре 37 °С или в термостате в течение 60 мин при температуре 37 °С.

7.2.2.3 Внести в каждую лунку по 50 мкл рабочего раствора Кг-2 (см. приготовление 7.1.6).

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в термостатирующем шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин в течение 20 мин при температуре 37 °С или в термостате в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.2.4 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть иммуносорбент пять раз рабочим раствором ФСБ-Т. Для этого внести в каждую лунку не менее 380 мкл рабочего раствора ФСБ-Т, а затем удалить содержимое лунок в емкость с дезраствором. При использовании устройства для промывки микропланшетов рекомендуется использовать режим отмывки с переполнением «Overflow» (с внесением в лунки иммуносорбента от 600 до 700 мкл рабочего раствора ФСБ-Т).

Остатки раствора из лунок удалить, активно постукивая перевернутым (лунками вниз) иммуносорбентом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

7.2.2.5 Внести в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (см. приготовление 7.1.7).

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в защищенном от света месте в

течение 15 мин при температуре 37 °С.

7.2.2.6 Остановить реакцию внесением в каждую лунку иммуносорбента по 50 мкл стоп-реагента.

7.2.3 Проведение ИФА по процедуре 2 при температуре 42 °С

7.2.3.1 Необходимое для проведения анализа число стрипов иммуносорбента вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.3.2 В лунки, предназначенные для контрольных образцов при проведении прямого и конкурентного ИФА, внести:

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

Во все лунки иммуносорбента, используемые для проведения прямого ИФА, внести по 100 мкл исследуемых образцов. Затем в лунки с контрольными и исследуемыми образцами внести по 50 мкл рабочего раствора КА (см. приготовление 7.1.5).

Во все лунки иммуносорбента, используемые для проведения конкурентного ИФА, внести по 100 мкл исследуемых образцов. Затем в лунки с контрольными и исследуемыми образцами внести по 50 мкл рабочего раствора ПА (см. приготовление 7.1.5).

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в термостатирующем шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин в течение 40 мин при температуре 42 °С.

7.2.3.3 Внести в каждую лунку по 50 мкл рабочего раствора Кг-2 (см. приготовление 7.1.6).

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в термостатирующем шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин в течение 20 мин при температуре 42 °С.

7.2.3.4 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть иммуносорбент пять раз рабочим раствором ФСБ-Т. Для этого внести в каждую лунку не менее 380 мкл рабочего раствора ФСБ-Т, а затем удалить содержимое лунок в емкость с дезраствором. При использовании устройства для промывки микропланшетов рекомендуется использовать режим отмывки с переполнением «Overflow» (с внесением в лунки иммуносорбента от 600 до 700 мкл рабочего раствора ФСБ-Т).

Остатки раствора из лунок удалить, активно постукивая перевернутым (лунками вниз) иммуносорбентом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

7.2.3.5 Внести в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (см. приготовление 7.1.7).

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при температуре 37 °С.

7.2.3.6 Остановить реакцию внесением в каждую лунку иммуносорбента по 50 мкл стоп-реагента.

7.2.4 Проведение ИФА по процедуре 2 при температуре 37 °С

7.2.4.1 Необходимое для проведения анализа число стрипов иммуносорбента вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.4.2 В лунки, предназначенные для контрольных образцов при проведении прямого и конкурентного ИФА, внести:

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

Во все лунки иммуносорбента, используемые для проведения прямого ИФА, внести по 100 мкл исследуемых образцов. Затем в лунки с контрольными и исследуемыми образцами внести по 50 мкл рабочего раствора КА (см. приготовление 7.1.5).

Во все лунки иммуносорбента, используемые для проведения конкурентного ИФА, внести по 100 мкл исследуемых образцов. Затем в лунки с контрольными и исследуемыми образцами внести по 50 мкл рабочего раствора ПА (см. приготовление 7.1.5).

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в термостатирующем шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин в течение 60 мин при температуре 37 °С.

7.2.4.3 Внести в каждую лунку по 50 мкл рабочего раствора Кг-2 (см. приготовление 7.1.6).

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в термостатирующем шейкере с

частотой вращения от 700 до 800 об/мин в течение 30 мин при температуре 37 °С.

7.2.4.4 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть иммуносорбент пять раз рабочим раствором ФСБ-Т. Для этого внести в каждую лунку не менее 380 мкл рабочего раствора ФСБ-Т, а затем удалить содержимое лунок в емкость с дезраствором. При использовании устройства для промывки микропланшетов рекомендуется использовать режим отмывки с переполнением «Overflow» (с внесением в лунки иммуносорбента от 600 до 700 мкл рабочего раствора ФСБ-Т).

Остатки раствора из лунок удалить, активно постукивая перевернутым (лунками вниз) иммуносорбентом по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

7.2.4.5 Внести в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (см. приготовление 7.1.7).

Иммуносорбент заклеить клейкой пленкой и инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при температуре 37 °С.

7.2.4.6 Остановить реакцию внесением в каждую лунку иммуносорбента по 50 мкл стоп-реагента.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить оптическую плотность (ОП) раствора 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 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 (прямой ИФА) менее 0,200 о.е.;

- среднее значение ОП в лунках с К+ (ОПК+ср.) при постановке с КА (прямой ИФА) более 1,000 о.е.;

- среднее значение ОП в лунках с К+ (ОПК+ср.) при постановке с ПА (конкурентный ИФА) не менее чем в 2 раза меньше, чем (ОПК+ср.) при постановке с КА (прямой ИФА).

ОП_{крит.} рассчитать по формуле 1

$$\text{ОП}_{\text{крит.}} = (\text{ОПК-ср.}) + 0,050, \quad (1)$$

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

Для каждого исследуемого образца рассчитать коэффициент подавления (К_{подавл.}) по формуле 2

$$K_{\text{подавл.}} = \frac{\text{ОП(КА)} - \text{ОП(ПА)}}{\text{ОП(КА)} - \text{ОП(К - ср.)}}, \quad (2)$$

где ОП(ПА) – ОП образца в лунках с ПА,

ОП(КА) – ОП образца в лунках с КА.

Интерпретация результатов

Результат считать **положительным** в случае, если ОП(КА) исследуемого образца больше ОП_{крит.}, а К_{подавл.} более 0,5 (независимо от величины ОП(ПА)).

Если ОП исследуемого образца в прямом ИФА больше 1,500 о.е., но коэффициент подавления менее 0,5, образец необходимо развести в 50 раз рабочим раствором ФСБ-Т (к 980 мкл рабочего раствора ФСБ-Т добавить 20 мкл образца) и повторить анализ.

Если ОП(КА) разведенного исследуемого образца больше ОП_{крит.} и коэффициент подавления более 0,5, то результат теста считать **положительным**.

Если после разведения образца в 50 раз сохраняется значение ОП больше 1,500 о.е. и коэффициент подавления сигнала менее 0,5, то исследуемый образец развести в 100 и более раз и повторить анализ.

Во всех остальных случаях результат теста считать **отрицательным**.

10 СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора реагентов «Инвитролоджик HBsAg-стрип-подтверждающий» 13 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.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов «Инвитролоджик HBsAg-стрип-подтверждающий», следует обращаться на предприятие-изготовитель по адресу:

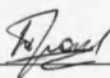
630117, г. Новосибирск-117, а/я-113, ЗАО «МБС»;

головной офис, тел./факс: 8-(383)-332-52-75;

отдел продаж, тел./факс: 8-(383)-332-81-38, 332-18-54, 339-91-97;

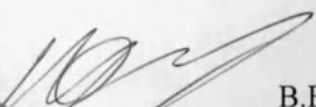
ОБТК, тел./факс: 8-(38341)-5-80-98, e-mail: obtk@mbu.ru

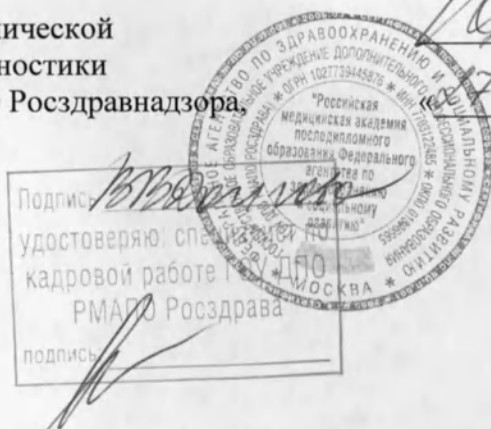
Ведущий научный сотрудник
ЗАО «МБС»

 А.В.Тронин
« 10 » 05 2014 г.

СОГЛАСОВАНО

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО РМАПО Росздравнадзора,
д.м.н., профессор

 В.В.Долгов
« 27 » 11 2014 г.



Прошнуровано,
пронумеровано и
скреплено печатью
9 (2014, 7)
Листов

