

УТВЕРЖДАЮ

Директор ЗАО

«Медико-биологический Союз»

М.В.Лосев

2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«Инвитролоджик HBsAg»

Набор реагентов для иммуноферментного определения поверхностного антигена HBsAg вируса гепатита В

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Выявление поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке, плазме крови человека и препаратах, приготовленных из крови человека для использования в клинических и эпидемиологических исследованиях, а также службой крови.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Набор реагентов «Инвитролоджик HBsAg» рассчитан на проведение 96, или 192, или 480 определений, включая контрольные образцы.

2.2 При исследовании небольшого количества образцов возможно проведение (для разборных планшетов) 12 или 24 независимых постановок ИФА по 8 анализов в каждой, включая контрольные образцы.

2.3 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 (конъюгат №1) и конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена (конъюгат №2).

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют с поликлональными антителами к HBsAg, сорбированными на поверхности лунок планшета, и конъюгатом №1. При наличии в исследуемом образце поверхностного антигена HBsAg происходит образование комплекса «антитело-антиген-конъюгат».

После инкубации исследуемого образца и конъюгата №1 в лунки планшета добавляют конъюгат №2, который выявляет комплекс «антитело-антиген-конъюгат».

После удаления несвязавшихся компонентов исследуемого образца, конъюгата №1 и конъюгата №2, связавшийся конъюгат №2 выявляют, добавляя в лунки планшета раствор хромогена.

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

Интенсивность окрашивания раствора в лунках планшета прямо пропорциональна содержанию поверхностного антигена HBsAg вируса гепатита В в исследуемом образце сыворотки.

2.2 Состав набора реагентов комплект 1

иммуносорбент – поликлональные антитела против HBsAg вируса гепатита В, сорбированные в лунках планшетов	разборный, 1 шт.	разделяемый по лунам, 1 шт.
К+ - положительный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, содержащая поверхностный антиген HBsAg вируса гепатита В, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и ВГС, - прозрачная красного цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)

Ксл+ - слабоположительный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, содержащая поверхностный антиген HBsAg вируса гепатита В, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и ВГС, - лиофилизированная светло-желтого цвета аморфная масса в виде таблетки или порошка	2 фл.	3 фл.
К- - отрицательный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС, антиген р24 ВИЧ-1 и HBs-антиген, - желтого цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)
Кг-1 - конъюгат №1 – моноклональные антитела против HBsAg, конъюгированные с биотином, - опалесцирующая бесцветная жидкость	1 фл. (0,75 мл)	1 фл. (0,75 мл)
РРК-1 - раствор для разведения конъюгата №1 – прозрачная синего цвета жидкость	1 фл. (6,0 мл)	1 фл. (6,0 мл)
Кг-2 - конъюгат №2 - стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена - опалесцирующая бесцветная жидкость	1 фл. (0,75 мл)	1 фл. (0,75 мл)
РРК-2 – раствор для разведения конъюгата №2 – прозрачная, оранжево-красного цвета жидкость	1 фл. (6,0 мл)	1 фл. (6,0 мл)
БРС – буферный раствор субстрата - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13,0 мл)	1 фл. (13,0 мл)
ТМБ – тетраметилбензидин – прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость	1 фл. (0,5 мл) или 1 фл. (1,0 мл)	1 фл. (0,5 мл) или 1 фл. (1,0 мл)
ФСБ-Т(х25) - 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (26,0 мл)	1 фл. (26,0 мл)
стоп-регент – 0,9 моль/л раствор кислоты серной - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (6,0 мл)	1 фл. (6,0 мл)
инструкция по применению	1 шт.	1 шт.

комплект 2

иммуносорбент – поликлональные антитела против HBsAg вируса гепатита В, сорбированные в лунках планшетов	разборный, 2 шт.	монолитный, 2 шт.
К+ - положительный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, содержащая поверхностный антиген HBsAg вируса гепатита В, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и ВГС, - прозрачная красного цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)
Ксл+ - слабоположительный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, содержащая поверхностный антиген HBsAg вируса гепатита В, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и ВГС, - лиофилизированная светло-желтого цвета аморфная масса в виде таблетки или порошка	4 фл.	2 фл.
К- - отрицательный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС, антиген р24 ВИЧ-1 и HBs-антиген, - желтого цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)
Кг-1 - конъюгат №1 – моноклональные антитела против HBsAg, конъюгированные с биотином, - опалесцирующая бесцветная жидкость	1 фл. (1,5 мл)	1 фл. (1,5 мл)

РРК-1 - раствор для разведения конъюгата №1 – прозрачная синего цвета жидкость	2 фл. (6,0 мл)	2 фл. (6,0 мл)
Кг-2 - конъюгат №2 - стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена - опалесцирующая бесцветная жидкость	1 фл. (1,5 мл)	1 фл. (1,5 мл)
РРК-2 – раствор для разведения конъюгата №2 – прозрачная, оранжево-красного цвета жидкость	2 фл. (6,0 мл)	2 фл. (6,0 мл)
БРС – буферный раствор субстрата - прозрачная бесцветная жидкость	2 фл. (13,0 мл)	2 фл. (13,0 мл)
ТМБ – тетраметилбензидин – прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость	1 фл. (1,0 мл) или 1 фл. (2,0 мл)	1 фл. (1,0 мл) или 1 фл. (2,0 мл)
ФСБ-Т(х25) - 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином - прозрачная бесцветная жидкость	2 фл. (26,0 мл)	2 фл. (26,0 мл)
стоп-реагент – 0,9 моль/л раствор кислоты серной - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (12,0 мл)	1 фл. (12,0 мл)
инструкция по применению	1 шт.	1 шт.

комплект 3

иммуносорбент – поликлональные антитела против HBsAg вируса гепатита В, сорбированные в лунках планшетов	разборный, 1 шт.	разборный, 2 шт.	монолитный, 2 шт.	разборный, 5 шт.
К+ - положительный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, содержащая поверхностный антиген HBsAg вируса гепатита В, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и ВГС, - прозрачная красного цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	2 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (10,0 мл)
Ксл+ - слабopоложительный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, содержащая поверхностный антиген HBsAg вируса гепатита В,	3 фл.	6 фл.	3 фл.	10 фл.

не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и ВГС, - лиофилизированная светло-желтого цвета аморфная масса в виде таблетки или порошка				
К- - отрицательный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС, антиген р24 ВИЧ-1 и HBs-антиген, - желтого цвета жидкость	1 фл. (3,0 мл)	3 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (20,0 мл)
Кг-1 - конъюгат №1 – моноклональные антитела против HBsAg, конъюгированные с биотином, - опалесцирующая бесцветная жидкость	1 фл. (1,0 мл) или 1 фл. (1,5 мл)	1 фл. (2,0 мл) или 2 фл. (1,0 мл)	1 фл. (2,0 мл) или 2 фл. (1,0 мл)	1 фл. (4,5 мл)
РРК-1 - раствор для разведения конъюгата №1 – прозрачная синего цвета жидкость	1 фл. (8,0 мл) или 2 фл. (6,0 мл)	2 фл. (8,0 мл) или 3 фл. (6,0 мл)	2 фл. (8,0 мл) или 3 фл. (6,0 мл)	1 фл. (40,0 мл)
Кг-2 - конъюгат №2 - стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена – опалесцирующая бесцветная жидкость	1 фл. (1,0 мл) или 1 фл. (1,5 мл)	1 фл. (2,0 мл) или 2 фл. (1,0 мл)	1 фл. (2,0 мл) или 2 фл. (1,0 мл)	1 фл. (4,5 мл)
РРК-2 – раствор для разведения конъюгата №2 – прозрачная, оранжево-красного цвета жидкость	1 фл. (8,0 мл) или 2 фл. (6,0 мл)	2 фл. (8,0 мл) или 3 фл. (6,0 мл)	2 фл. (8,0 мл) или 3 фл. (6,0 мл)	1 фл. (40,0 мл)
БРС – буферный раствор субстрата - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (20,0 мл) или 2 фл. (13,0 мл)	2 фл. (20,0 мл) или 4 фл. (13,0 мл)	2 фл. (20,0 мл) или 4 фл. (13,0 мл)	2 фл. (40,0 мл)

ТМБ – тетраметил-бензидин – прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость	1 фл. (1,0 мл) или 1 фл.(2,0 мл)	1 фл. (2,0 мл) или 2 фл.(2,0 мл)	1 фл. (2,0 мл) или 2 фл.(2,0 мл)	1 фл.(3,0 мл) или 2 фл. (3,0 мл)
ФСБ-Т(х25) - 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (50,0 мл) или 2 фл. (26,0 мл)	2 фл. (50,0 мл) или 4 фл. (26,0 мл)	2 фл. (50,0 мл) или 4 фл. (26,0 мл)	1 фл. (125,0 мл)
стоп-реагент – 0,9 моль/л раствор кислоты серной - прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (12,0 мл)	2 фл. (12,0 мл)	2 фл. (12,0 мл)	1 фл. (40,0 мл)
инструкция по применению	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.

Дополнительно в набор реагентов вкладывают: клейкую пленку для планшета, пластиковые емкости для растворов, одноразовые наконечники для дозаторов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Чувствительность по «ОСО HBsAg» (ОСО 42-28-311) при проведении анализа по процедуре 1 должна составлять 0,05 МЕ/мл.

3.2 Чувствительность по «ОСО HBsAg» (ОСО 42-28-311) при проведении анализа по процедуре 2 должна составлять 0,01 МЕ/мл.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 26 (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. Стоп-реагент 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 образцы и исследуемые сыворотки следует рассматривать как потенциально инфицированные.

4.5 Твердые отходы, промывные растворы собрать в специальном контейнере и затем обработать дезсредствами, разрешенными в установленном порядке для применения на территории РФ, 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 в установленном порядке 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 400 мкл, или анализатор автоматический открытого типа;

- 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;

- 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;

- перчатки резиновые.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Для проведения анализа использовать образцы сыворотки (плазмы) крови человека объемом 110 мкл.

6.2 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 .

6.3 Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки готовить и хранить в условиях, исключающих возможность бактериального пророста. Необходимо осветлять образцы сывороток, 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. 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 реагентов 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

• 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 реагентов, и образцы исследуемых сывороток перед проведением анализа тщательно перемешать.

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

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

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

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

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

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

7.1.2 Подготовка РРК-1, РРК-2, БРС

РРК-1, РРК-2, БРС готовы к применению.

Хранение: неиспользованные РРК-1, РРК-2, БРС в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С в плотно закрытых флаконах.

7.1.3 Подготовка контрольных образцов

К+ и К- готовы к применению.

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

Восстановление Ксл+

Восстановление Ксл+ провести за 15 мин до постановки анализа.

Внести 1,0 мл воды очищенной во флакон с Ксл+. Флакон закрыть пробкой, выдержать в течение 10 мин при температуре от 17 °С до 27 °С, затем тщательно перемешать содержимое флакона встряхиванием.

Хранение: восстановленный Ксл+ хранить в закрытом флаконе при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 месяца, при температуре минус 20 °С - не более 6 месяцев. Допускается однократное замораживание и оттаивание восстановленного Ксл+.

7.1.4 Приготовление рабочего раствора Кг-1

Внимание! Рабочий раствор Кг-1 готовить непосредственно перед использованием.

Из флакона с Кг-1 отобрать указанный на этикетке объем (*V* в мл) и перенести во флакон с РРК-1. Раствор тщательно перемешать, не допуская образования пены.

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

Хранение: рабочий раствор Кг-1 не более 5 мин при температуре от 17 °С до 27 °С неиспользованный Кг-1 - в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С в плотно закрытых флаконах

7.1.5 Приготовление рабочего раствора Кг-2

Внимание! Рабочий раствор Кг-2 готовить непосредственно перед использованием.

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

При постановке ИФА 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 5 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.

7.1.6 Приготовление рабочего раствора ТМБ

Внимание! Рабочий раствор ТМБ готовить непосредственно перед использованием.

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

При постановке ИФА на отдельных стрипах иммуносорбента в чистый флакон отобрать

необходимые объемы БРС и ТМБ (см. таблицу 1).

Хранение: рабочий раствор ТМБ не более 5 мин при температуре от 17 °С до 27 °С в защищенном от света месте, неиспользованный ТМБ - в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1.7 Подготовка иммуносорбента

Иммуносорбент готов к использованию.

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

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.

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

Компонент	Количество используемых стрипов, шт.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
комплект 1, комплект 2												
ФСБ-Т(х25)	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	14,0	16,0	18,0	20,0	22,0	26,0
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 650
РРК-1	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
Кг-1	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6
РРК-2	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
Кг-2	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6
БРС	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	13,0
ТМБ	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15	0,18	0,21	0,24	0,27	0,30	0,33	0,4
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	50,0
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 1250
РРК-1	0,7	1,3	2,0	2,7	3,3	4,0	4,7	5,3	6,0	6,7	7,3	8,0
Кг-1	0,07	0,13	0,2	0,27	0,33	0,4	0,47	0,53	0,6	0,67	0,73	0,8
РРК-2	0,7	1,3	2,0	2,7	3,3	4,0	4,7	5,3	6,0	6,7	7,3	8,0
Кг-2	0,07	0,13	0,2	0,27	0,33	0,4	0,47	0,53	0,6	0,67	0,73	0,8
БРС	1,6	3,2	4,8	6,4	8,0	9,6	11,2	12,8	14,4	16,0	17,6	20,0
ТМБ	0,048	0,096	0,144	0,192	0,240	0,290	0,340	0,380	0,430	0,480	0,530	0,6

7.2 Проведение ИФА

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

• При постановке ИФА на одном или двух стрипах допускается использовать для внесения К- – две лунки, для внесения К+ и Ксл+ – по одной лунке для каждого.

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

• При внесении в лунки рабочего раствора Кг-1 или Кг-2 нельзя касаться наконечником пипетки поверхности планшета и раствора, находящегося в лунках во избежание случайного заноса образца из одного стрипа в другой через наконечники.

7.2.1.1 Проведение ИФА по процедуре 1 при температуре 42 °С

7.2.1.1.1 Необходимое для проведения ИФА число стрипов планшета вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.1.1.2 В лунки, предназначенные для контролей, внести:

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

Во все остальные лунки планшета внести по 100 мкл исследуемых сывороток.

Во все лунки с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами внести по 50 мкл рабочего раствора Кг-1 (приготовление см. 7.1.4).

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

7.2.1.1.4 По окончании инкубации внести в каждую лунку планшета по 50 мкл рабочего раствора Кг-2 (приготовление см. 7.1.5).

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

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

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

7.2.1.1.7 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (приготовление см. 7.1.6).

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

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

7.2.1.2 Проведение ИФА по процедуре 1 при температуре 37 °С

7.2.1.2.1 Необходимое для проведения ИФА число стрипов планшета вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.1.2.2 В лунки, предназначенные для контролей, внести:

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

Во все остальные лунки планшета внести по 100 мкл исследуемых сывороток.

Во все лунки с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами внести по 50 мкл рабочего раствора Кг-1 (приготовление см. 7.1.4).

7.2.1.2.3 Планшет заклеить клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С в термостатируемом шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин.

7.2.1.2.4 По окончании инкубации внести в каждую лунку планшета по 50 мкл рабочего раствора Кг-2 (приготовление см. 7.1.5).

7.2.1.2.5 Планшет заклеить клейкой пленкой и инкубировать в течение 20 мин при температуре 37 °С в термостатируемом шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин.

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

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

7.2.1.2.7 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (приготовление см. 7.1.6).

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

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

7.2.1.3 Проведение ИФА по процедуре 2 при температуре 42 °С

7.2.1.3.1 Необходимое для проведения ИФА число стрипов планшета вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.1.3.2 В лунки, предназначенные для контролей, внести:

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

Во все остальные лунки планшета внести по 100 мкл исследуемых сывороток.

Во все лунки с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами внести по 50 мкл рабочего раствора Кг-1 (приготовление см. 7.1.4).

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

7.2.1.3.4 По окончании инкубации внести в каждую лунку планшета по 50 мкл рабочего раствора Кг-2 (приготовление см. 7.1.5).

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

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

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

7.2.1.3.7 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (приготовление см. 7.1.6).

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

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

7.2.1.4 Проведение ИФА по процедуре 2 при температуре 37 °С

7.2.1.4.1 Необходимое для проведения ИФА число стрипов планшета вынуть из пакета и закрепить на рамке. Оставшиеся стрипы упаковать в пакет с влагопоглотителем.

7.2.1.4.2 В лунки, предназначенные для контролей, внести:

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

Во все остальные лунки планшета внести по 100 мкл исследуемых сывороток.

Во все лунки с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами внести по 50 мкл рабочего раствора Кг-1 (приготовление см. 7.1.4).

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

7.2.1.4.4 По окончании инкубации внести в каждую лунку планшета по 50 мкл рабочего раствора Кг-2 (приготовление см. 7.1.5).

7.2.1.4.5 Планшет заклеить клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 °С в термостатируемом шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин.

7.2.1.4.6 По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет семь раз рабочим раствором ФСБ-Т. Для этого внести в каждую лунку планшета не менее 380 мкл

рабочего раствора ФСБ-Т, а затем удалить содержимое лунок в емкость с дезраствором. При использовании для промывки устройства для промывки микропланшетов рекомендуется использовать режим отмычки с переполнением «Overflow» (с внесением в лунки планшета от 600 до 700 мкл рабочего раствора ФСБ-Т).

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

7.2.1.4.7 Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (приготовление см. 7.1.6).

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

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

7.2.2 Проведение ИФА на автоматическом анализаторе открытого типа (комплект 3)

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

7.2.2.2 Залить рабочий раствор ФСБ-Т в предназначенную для него емкость анализатора.

7.2.2.3 Залить остальные рабочие растворы, реагенты, К⁺, Ксл⁺, К⁻ и исследуемые образцы сывороток в специальные контейнеры.

7.2.2.4 Поместить в анализатор иммуносорбент.

7.2.2.5 Задать программу проведения ИФА

процедура 1 (постановка ИФА при температуре 42 °С)

Внесение растворов	полный планшет	постриповая постановка (1 или 2 стрипа)
	2 лунки – по 100 мкл К ⁺ 2 лунки – по 100 мкл Ксл ⁺ 2 лунки – по 100 мкл К ⁻ во все лунки, кроме контрольных – по 100 мкл исследуемых образцов во все лунки – по 50 мкл рабочего раствора Кг-1	1 лунка – по 100 мкл К ⁺ 1 лунка – по 100 мкл Ксл ⁺ 2 лунки – по 100 мкл К ⁻ во все лунки, кроме контрольных – по 100 мкл исследуемых образцов во все лунки – по 50 мкл рабочего раствора Кг-1
Инкубация	20 мин при температуре 42 °С при перемешивании в термостатируемом шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин	
Внесение раствора	по 50 мкл рабочего раствора Кг-2	
Инкубация	10 мин при температуре 42 °С при перемешивании в термостатируемом шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин	
Промывка	7 раз рабочим раствором ФСБ-Т до полного заполнения лунок	
Внесение раствора	по 100 мкл рабочего раствора ТМБ	
Инкубация	15 мин при температуре от 37 °С в защищенном от света месте	
Внесение раствора	по 50 мкл стоп-реагента	

процедура 1 (постановка ИФА при температуре 37 °С)

Внесение растворов	полный планшет	постриповая постановка (1 или 2 стрипа)
	2 лунки – по 100 мкл К ⁺ 2 лунки – по 100 мкл Ксл ⁺ 2 лунки – по 100 мкл К ⁻ во все лунки, кроме контрольных – по 100 мкл исследуемых образцов во все лунки – по 50 мкл рабочего раствора Кг-1	1 лунка – по 100 мкл К ⁺ 1 лунка – по 100 мкл Ксл ⁺ 2 лунки – по 100 мкл К ⁻ во все лунки, кроме контрольных – по 100 мкл исследуемых образцов во все лунки – по 50 мкл рабочего раствора Кг-1

Инкубация	30 мин при температуре 37 °С при перемешивании в термостатируемом шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин
Внесение раствора	по 50 мкл рабочего раствора Кг-2
Инкубация	20 мин при температуре 37 °С при перемешивании в термостатируемом шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин
Промывка	7 раз рабочим раствором ФСБ-Т до полного заполнения лунок
Внесение раствора	по 100 мкл рабочего раствора ТМБ
Инкубация	15 мин при температуре от 37 °С в защищенном от света месте
Внесение раствора	по 50 мкл стоп-реагента

процедура 2 (постановка ИФА при температуре 42 °С)

Внесение растворов	полный планшет	постриповая постановка (1 или 2 стрипа)
	2 лунки – по 100 мкл К+ 2 лунки – по 100 мкл Ксл+ 2 лунки – по 100 мкл К- во все лунки, кроме контрольных – по 100 мкл исследуемых образцов во все лунки – по 50 мкл рабочего раствора Кг-1	1 лунка – по 100 мкл К+ 1 лунка – по 100 мкл Ксл+ 2 лунки – по 100 мкл К- во все лунки, кроме контрольных – по 100 мкл исследуемых образцов во все лунки – по 50 мкл рабочего раствора Кг-1
Инкубация	40 мин при температуре 42 °С при перемешивании в термостатируемом шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин	
Внесение раствора	по 50 мкл рабочего раствора Кг-2	
Инкубация	20 мин при температуре 42 °С при перемешивании в термостатируемом шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин	
Промывка	7 раз рабочим раствором ФСБ-Т до полного заполнения лунок	
Внесение раствора	по 100 мкл рабочего раствора ТМБ	
Инкубация	15 мин при температуре от 37 °С в защищенном от света месте	
Внесение раствора	по 50 мкл стоп-реагента	

процедура 2 (постановка ИФА при температуре 37 °С)

Внесение растворов	полный планшет	постриповая постановка (1 или 2 стрипа)
	2 лунки – по 100 мкл К+ 2 лунки – по 100 мкл Ксл+ 2 лунки – по 100 мкл К- во все лунки, кроме контрольных – по 100 мкл исследуемых образцов во все лунки – по 50 мкл рабочего раствора Кг-1	1 лунка – по 100 мкл К+ 1 лунка – по 100 мкл Ксл+ 2 лунки – по 100 мкл К- во все лунки, кроме контрольных – по 100 мкл исследуемых образцов во все лунки – по 50 мкл рабочего раствора Кг-1
Инкубация	60 мин при температуре 37 °С при перемешивании в термостатируемом шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин	
Внесение раствора	по 50 мкл рабочего раствора Кг-2	
Инкубация	30 мин при температуре 37 °С при перемешивании в термостатируемом шейкере с частотой вращения от 700 до 800 об/мин	
Промывка	7 раз рабочим раствором ФСБ-Т до полного заполнения лунок	
Внесение раствора	по 100 мкл рабочего раствора ТМБ	

Инкубация	15 мин при температуре от 37 °С в защищенном от света месте
Внесение раствора	по 50 мкл стоп-реагента

7.2.2.6 Включить анализатор.

7.2.2.7 По окончании анализа прибор выдаст протокол результатов исследования.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить оптическую плотность (ОП) раствора 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. 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.) не превышает 0,200 о.е.;
- среднее значение ОП в лунках с К+ (ОПК+ср.) более 1,000 о.е.;
- среднее значение ОП в лунках с Ксл+ (ОПКсл+ср.) более ОПкрит.

ОПкрит. рассчитать по формуле 1

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

где (ОПК-ср.) — среднее значение ОП (ОПК-) по двум лункам.

Для интерпретации результатов следует использовать коэффициент позитивности (КП), рассчитанный по формуле 2

$$\text{КП} = \frac{(\text{ОПиссл.сыв.})}{\text{ОПкрит.}} \quad (2)$$

Исследуемую сыворотку расценивать как *положительную*, т.е. содержащую поверхностный антиген HBsAg вируса гепатита В, если КП исследуемой сыворотки равен или превышает 1,0.

Исследуемую сыворотку расценивать как *отрицательную*, если КП исследуемой сыворотки ниже 1,0.

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.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться:

- 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
Клинического института
М.Ф. Владимирского
(МОНИКИ)



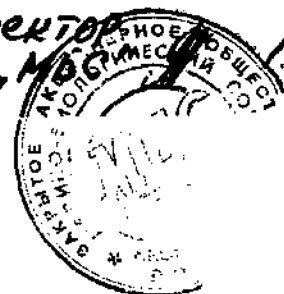
В.И. Шумский

2009 г.

ПРОШНУРОВАНО и
ПРОБРОШНУРОВАНО 14 листов

Директор
ЗАО «МОСГРИМЕСИ»

М.В.



2013.03.13

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

Г.Г.Онищенко

«___» _____ 200__ г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«Инвитролоджик HBsAg»

Набор реагентов для иммуноферментного определения поверхностного
антигена HBsAg вируса гепатита В

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Выявление поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке, плазме крови человека и препаратах, приготовленных из крови человека для использования в клинических и эпидемиологических исследованиях, а также службой крови.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Набор реагентов «Инвитролоджик HBsAg» рассчитан на проведение 96, или 192, или 480 определений, включая контрольные образцы.

2.2 При исследовании небольшого количества образцов возможно проведение (для разборных планшетов) 12 или 24 независимых постановок ИФА по 8 анализов в каждой, включая контрольные образцы.

2.3 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 (конъюгат №1) и конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена (конъюгат №2).

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют с поликлональными антителами к HBsAg, сорбированными на поверхности лунок планшета, и конъюгатом №1. При наличии в исследуемом образце поверхностного антигена HBsAg происходит образование комплекса «антитело-антиген-конъюгат».

После инкубации исследуемого образца и конъюгата №1 в лунки планшета добавляют конъюгат №2, который выявляет комплекс «антитело-антиген-конъюгат».

После удаления несвязавшихся компонентов исследуемого образца, конъюгата №1 и конъюгата №2, связавшийся конъюгат №2 выявляют, добавляя в лунки планшета раствор хромогена.

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

Интенсивность окрашивания раствора в лунках планшета прямо пропорциональна содержанию поверхностного антигена HBsAg вируса гепатита В в исследуемом образце сыворотки.

2.2 Состав набора реагентов

комплект 1

иммуносорбент – поликлональные антитела против HBsAg вируса гепатита В, сорбированные в лунках планшетов	разборный, 1 шт.	разделяемый по лункам, 1 шт.
К+ - положительный контрольный образец, инактивированный - сыворотка крови человека, содержащая поверхностный антиген HBsAg вируса гепатита В, не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и	1 фл. (3,0 мл)	1 фл. (3,0 мл)

СОГЛАСОВАНО

И.О. директора **ФНП ИСК**
им. Л.А.Тарасовна Госпотребнадзора
Руководитель Национального органа
контроля МИА



" 02 " 09 2007 г.