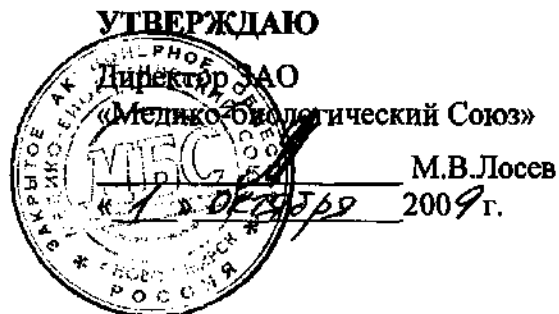




ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Инвитролоджик HBcoreAg-антитела»

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

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Инвитролоджик HBcoreAg-антитела» предназначен для выявления суммарных антител к core-антигену вируса гепатита В (HBcoreAg) в сыворотке, плазме крови человека и препаратах, приготовленных из крови человека, методом конкурентного 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 на разборных планшетах возможно проведение 12 или 24 независимых постановок ИФА по 8 анализов в каждой, включая контрольные образцы.

2.3 Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантного core-антигена (антигена сердцевин) вируса гепатита В и поликлональных антител человека к HBcoreAg, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Исследуемые сыворотки и раствор конъюгата инкубируют с иммобилизованным на поверхности лунок планшета HBcoreAg. При этом имеющиеся в сыворотке и растворе конъюгата специфические антитела к HBcoreAg конкурируют между собой за образование комплекса с рекомбинантным HBcoreAg, иммобилизованным на твердой фазе. При наличии в исследуемой сыворотке антител к HBcoreAg образуются комплексы антиген-антитело, препятствующие связыванию антигена с антителами конъюгата. При отсутствии в исследуемой сыворотке антител к HBcoreAg антитела конъюгата беспрепятственно образуют комплексы с антигеном, иммобилизованным на твердой фазе.

После завершения инкубации удаляют несвязавшиеся компоненты сыворотки и конъюгата. Конъюгированные антитела выявляют, добавляя в лунки планшета раствор хромогена. При этом в лунках, не содержащих антитела к HBcoreAg, происходит изменение окраски раствора.

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

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 или 192 определения.

2.5 Состав комплектов приведен в таблице 1.

Таблица 1

Наименование компонента	Комплект 1		Комплект 2	Комплект 3		
Иммуносорбент – рекомбинантный соге-антиген вируса гепатита В, сорбированный в лунках планшетов	разбор- ный, 1 шт.	разде- ляемый по лункам, 1 шт.	разбор- ный, 2 шт.	разборный, 1 шт.	разборный, 2 шт.	монолит- ный, 2 шт.
К+ – инактивированный контрольный положи- тельный 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 отрица- тельный 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, ванночки для реагентов, одноразовые наконечники для дозаторов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Подлинность. Набор реагентов 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 реагентов выявлять положительные сыворотки рабочей панели «РП-АТ(+/-)HBcoreAg» методом ИФА без ложноотрицательных результатов – 100 %.

3.2 Специфичность. Степень способности набора реагентов выявлять отрицательные сыворотки рабочей панели «РП-АТ(+/-)HBcoreAg» 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, 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 температуре от 17 °C до 27 °C 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;

- анализатор автоматический открытого типа;

- цилиндр мерный второго класса точности вместимостью 1000 мл;

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

- бумага фильтровальная лабораторная;

- вода очищенная;

- спирт этиловый;

- водорода перекись;

- перчатки резиновые.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2 Для проведения анализа использовать сыворотку, плазму крови человека объемом 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

Комплект перед проведением анализа выдержать 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 одного флакона с ФСБ-Т(х25) перенести в мерный цилиндр, разбавить в 25 раз водой очищенной и тщательно перемешать.

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 – Расход реагентов для постановки анализа на одном планшете

Объем, мл	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	24,0
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 600
РК	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
РХ	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
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
РК	0,75	1,5	2,25	3	3,75	4,5	5,25	6	6,75	7,5	8,25	9
РХ	1,7	3,4	5,0	6,8	8,5	10,0	11,7	13,4	15,0	17,0	18,7	20,0
Стоп-реагент	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

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 РК и РХ

РК и РХ готовы к использованию.

Хранение: неиспользованные РК и РХ в закрытых флаконах в течение срока годности набора реагентов 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 реагентов 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 реагентов 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, вскрыть флаконы с остальными реагентами и контрольными образцами

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

При постановке ИФА на отдельных стрипах допускается использовать для К- две лунки, для К+ – одну лунку.

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

7.2.1.4 Во все лунки иммуносорбента 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 и контрольных образцов, РК и исследуемых сывороток в лунки иммуносорбента (см. 7.3.1).

Содержимое лунок перемешать осторожным постукиванием по краю иммуносорбента.

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 планшета 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 10 мин в защищенное от света место при температуре 37 °С.

При необходимости допускается проведение оптического контроля точности внесения РХ в лунки иммуносорбента (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 (приготовление см. 7.1.2).

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

7.2.2.3 Поместить в анализатор иммуносорбент.

7.2.2.4 Задать программу проведения ИФА:

Внесение растворов	<u>Полный планшет</u> 2 лунки – по 50 мкл К+; 3 лунки – по 50 мкл К-; остальные лунки – по 50 мкл исследуемых сывороток; все лунки – по 50 мкл РК	<u>Постриповая постановка</u> 1 лунка – 50 мкл К+; 2 лунки – по 50 мкл К-; 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 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 РК и контрольные образцы, РК 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 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:

- 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.

ОП_{крит.} рассчитать по формуле

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

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

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

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

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).

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 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 института
им.М.Ф.Владимирского (МОНИКИ)



В.И.Шумский

200 ____ г.

ПРОШКУРОВАНО И ПРОБРОШУРО-
ВАНО

7 листов
Директор ЗАВМРС* Лосев М.В.

