

УТВЕРЖДЕНА

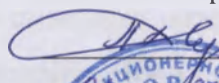
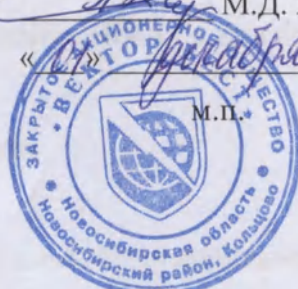
Приказом Росздравнадзора

от _____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»


М.Д. Хусаинов
«17» сентября 2011 г.
М.П.


ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного количественного определения
HBs-антигена вируса гепатита В в сыворотке (плазме) крови
«HBsAg-ИФА-БЕСТ-количественный»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «HBsAg-ИФА-БЕСТ-количественный» (далее по тексту – набор) предназначен для иммуноферментного количественного определения HBs-антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 30 неизвестных образцов, 5 калибровочных образцов и 1 контрольного образца (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения представляет собой двустадийный твердофазный иммуноферментный анализ.

На первой стадии анализа исследуемые образцы инкубируют в лунках планшета с иммобилизованными моноклональными антителами к HBsAg. Имеющийся в образцах HBsAg связывается с моноклональными антителами, формируя комплекс «антиген–антитело».

На второй стадии связавшийся HBsAg взаимодействует с биотинилированными поликлональными антителами к HBsAg; затем стрептавидин, меченный пероксидазой хрена, связывается с биотинилированными поликлональными антителами к HBsAg. Комплекс «антиген–антитело» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – пере-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией НИИ СД И.Н. Кувшиновой и с.н.с. НИИ СД С.В. Молодых.



кси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых образцах.

Концентрацию HBsAg в анализируемых образцах сывороток определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания HBsAg в калибровочных образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы, аттестованные относительно WHO Second International Standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A NIBSC code: 00/588, содержащие известные количества HBsAg: 0; 0,05; 2; 5; 10 МЕ/мл, готовые для использования – 5 фл. по 1,3 мл;
- контрольный образец, с известной концентрацией HBsAg, готовый для использования – 1 фл., 1,3 мл;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПР) – 1 фл., 12 мл;
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 фл., 12 мл;
- конъюгат №1 (биотинилированные поликлональные антитела к HBsAg), готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- конъюгат №2 (стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена), готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1 фл., 1,0 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночкой для реагента – 3 шт.;
- наконечниками для пипетки на 4 – 200 мкл – 24 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- планшетом для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность. Минимально определяемая концентрация HBsAg, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного об-

14
из ОП₀, плюс 2σ (σ - среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения ОП₀) не превышает 0,05 МЕ/мл.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации по результатам определения содержания HBsAg в одном и том же образце с использованием набора «HBsAg-ИФА-БЕСТ-количественный» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Отклонение от расчётной величины концентрации HBsAg при разведении калибровочного образца, содержащего 10 МЕ/мл, в 2 раза; калибровочного образца, содержащего 5 МЕ/мл, в 2,5 раза, калибровочного образца, содержащего 2 МЕ/мл, в 40 раз, составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации HBsAg предписанной в образце, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 2 МЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

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

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор,

например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

Для работы с набором необходимо следующее дополнительное оборудование и материалы:

спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 405 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм;

термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 400–800 об/мин и температуре 37 ± 1 °С;

дозаторы полуавтоматические одноканальные и многоканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;

промывочное устройство для планшетов;

флаконы стеклянные вместимостью 10–15 мл;

перчатки резиновые хирургические;

цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100, 1000 мл;

вода дистиллированная;

дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут или при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре от 18 до 25 °С не менее 60 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения ана-

иза количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок;

Оставшиеся неиспользованными стрипы хранить при от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление калибровочных и контрольного образцов

Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию.

Перед проведением анализа флаконы с калибровочными образцами и контрольным образцом встряхнуть.

Калибровочные и контрольный образцы хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.4. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30-40 °C до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 сут.

7.5. Подготовка конъюгата №1

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата №1.

Конъюгат №1 хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.6. Подготовка конъюгата №2

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата №2.

Конъюгат №2 хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищённом от света месте при температуре от 18 до 25 °С не более 6 ч.

Таблица

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат № 1	Конъюгат № 2	Рабочий раствор тетраметилбензидина	
	ФСБ-Т×25, мл	Дистилли- рованная вода, мл			Концентрат тетраметил- бензидина, мл	СБР, мл
2	4,0	до 100	2,0	2,0	0,10	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0	0,15	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0	0,20	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0	0,25	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0	0,30	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0	0,35	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0	0,40	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0	0,45	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0	0,50	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0	0,55	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0	0,60	12,0

7.8. Подготовка исследуемых образцов

Каждый из исследуемых образцов анализируется без разведения (цельный), в разведении 1/100 и 1/10 000.

Для разведения одного образца понадобится четыре лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов, например, А-1, В-1 С-1, D-1.

В лунки А-1,С-1 планшета внести по 135 мкл РПР, в лунки В-1, D-1– по 135 мкл РРС.

Разведение 1/100. В лунку А-1 внести 15 мкл цельного исследуемого образца. Поменять наконечник, раствор в лунке тщательно перемешать. Фиолетовый цвет раствора должен измениться на синий. Затем из лунки А-1 отобрать 15 мкл раствора, перенести в лунку В-1, поменять наконечник, тщательно перемешать. В лунке В-1 получено разведение исследуемого образца 1/100.

Разведение 1/10 000. Из лунки В-1 отобрать 15 мкл раствора, перенести в лунку С-1. Поменять наконечник, раствор в лунке тщательно перемешать. Затем из лунки С-1 отобрать 15 мкл раствора, перенести в лунку D-1, поменять наконечник, тщательно перемешать. В лунке D-1 получено разведение исследуемого образца 1/10 000.

Аналогично подготовить к анализу все исследуемые образцы.

Хранение: до 1 часа при 18–25°C.

7.9. Внести в лунки планшета по 100 мкл калибровочных образцов 0; 0,05; 2; 5; 10 МЕ/мл и 100 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести по 100 мкл цельных исследуемых образцов сывороток, а также по 100 мкл исследуемых образцов в разведениях 1/100 и 1/10000 (перенести из соответствующих лунок планшета для предварительного разведения исследуемых образцов).

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение 15-20 мин.

7.10. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

7.11. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.4) чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. При этом в каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе одного промывания.

Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата №1 (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата №1 использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.13. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

7.14. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата №2 (см п. 7.6).

Для внесения конъюгата №2 использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.15. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

7.16. По окончании инкубации промыть планшет 5 раз как описано выше (см. п. 7.11.).

7.17. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см. п. 7.7) и инкубировать в темноте в течение 30 мин при температуре от 18 до 25 °C.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.18. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить оптическую плотность в лунках с помощью спектрофотометра: основной фильтр – 405 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

– $B_0 \leq 0,1$ ед. опт. плотн., где B_0 – значения оптической плотности в лунках с калибровочным образцом 0 МЕ/мл;

– $B_{10} \geq 1,5$ ед. опт. плотн., где B_{10} – значения оптической плотности в лунках с калибровочным образцом 10 МЕ/мл.

9.2. Результат анализа считать отрицательным, если $B_{обр.} < B_{0,05}$, где $B_{обр.}$ – оптическая плотность в лунке с исследуемым образцом, $B_{0,05}$ – значение оптической плотности в лунках калибровочным образцом 0,05 МЕ/мл. Такие образцы количественному анализу не подлежат.

9.3. Определение концентрации HBsAg

9.3.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации HBsAg в калибровочных образцах (МЕ/мл).

9.3.2. Определить содержание HBsAg в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Полученную концентрацию HBsAg умножить на фактор разведения.

9.3.3. Если значение ОП анализируемого образца в разведении 1/10 000 превышает ОП калибровочного образца 10 МЕ/мл, следует повторить анализ образца в разведении 1/1 000 000, (алгоритм разведения см. п. 7.8).

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование наборов должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов «HBsAg-ИФА-БЕСТ-количественный» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор, раствор для разведения сывороток, раствор для предварительного разведения сывороток и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- концентрат тетраметилбензидина после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- калибровочные образцы, контрольный образец, конъюгат №1 и конъюгат №2 после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут;
- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С не более 6 ч.

10.4. Построение калибровочного графика и определение концентрации HBsAg в контрольном образце необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

10.5. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес, допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

10.6. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.7. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-25, СБР, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «HBsAg-ИФА-БЕСТ-количественный»,
следует обращаться в **ЗАО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383)
363-13-46, 227-75-40, тел./факс (383) 363-20-60.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Зав. лаборатории маркеров
вирусных инфекций НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

И.Н Кувшинова

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России



д.м.н., профессор В.В. Долгов

«20» 12 2011 г.

Подпись	<u>В.В. Долгов</u>
удостоверяю:	
Специалист по кадрам РМАПО	
Подпись	<u>А.В. Петров</u>
« <u>20</u> » <u>12</u> 20 <u>11</u> года	

... (faint text) ...

... (faint text) ...

... (faint text) ...



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
десять листов

А. (Берришова Е.А.)