

УТВЕРЖДЕНА

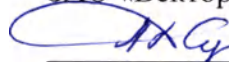
Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

«06» _____ 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного подтверждения
присутствия HBs-антигена вируса гепатита В
«HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ (далее по тексту – набор) предназначен для подтверждения присутствия HBs-антигена вируса гепатита В методом конкурентного иммуноферментного анализа, основанного на принципе нейтрализации HBsAg специфическими антителами. Положительный результат, полученный в постановке любого комплекта набора реагентов HBsAg-ИФА-БЕСТ, должен быть подтвержден в реакции нейтрализации с использованием набора HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ. Минимальная концентрация HBsAg, выявляемая с помощью данного набора, составляет по стандартному образцу предприятия, содержащему HBsAg (рег. № 05-2-433), аттестованному ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», 0,01 МЕ/мл.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 44 неизвестных образца, 4 контрольных образцов, всего 48 определений при использовании всего планшета. Для исследования небольшой партии проб предусмотрено использование 2 стрипов по 8 анализов (4 контрольных образцов и 4 неизвестных образцов).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации при добавлении в лунки планшета исследуемого образца и биотинилиро-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым и зав. лабораторией И.Н. Кувишиновой

7

ванных поликлональных антител происходит связывание моноклональных антител, иммобилизованных на внутренней поверхности лунок, и биотинилированных поликлональных антител с HBsAg в анализируемом образце. Во время второй инкубации стрептавидин, меченный пероксидазой, связывается с биотинилированными поликлональными антителами к HBsAg, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Во время третьей инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы антиген-антитело. Степень окраски пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых пробах. Если во время первой инкубации в лунки дополнительно добавляется раствор подтверждающего агента, содержащий антитела к HBs-антигену, происходит нейтрализация HBsAg, что в конечном итоге приводит к уменьшению степени окраски (подавлению сигнала) в лунках на последней стадии ИФА. Если % подавления сигнала 50% и более, то исследуемый образец считают положительным. Таким образом, для подтверждения присутствия HBsAg исследуемые образцы анализируют попарно – в прямом ИФА (без добавления подтверждающего агента) и в конкурентном ИФА (с добавлением подтверждающего агента).

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), содержащий рекомбинантный HBsAg, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- слабоположительный контрольный образец ($K^+_{\text{слаб}}$), содержащий рекомбинантный HBsAg в концентрации $(0,04 \pm 0,02)$ МЕ/мл, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-), не содержащий HBsAg, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат № 1, концентрат – биотинилированные поликлональные антитела к HBsAg – 1 флакон (0,8 мл);
- конъюгат № 2, концентрат – конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена – 1 флакон (1,5 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата №1 (РПК №1) – 1 флакон (7,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата №2 (РПК №2) – 1 флакон (13,0 мл);
- раствор подтверждающего агента (РПА) – 1 флакон (3,0 мл);

ванных поликлональных антител происходит связывание моноклональных антител, иммобилизованных на внутренней поверхности лунок, и биотинилированных поликлональных антител с HBsAg в анализируемом образце. Во время второй инкубации стрептавидин, меченный пероксидазой, связывается с биотинилированными поликлональными антителами к HBsAg, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Во время третьей инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы антиген-антитело. Степень окраски пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых пробах. Если во время первой инкубации в лунки дополнительно добавляется раствор подтверждающего агента, содержащий антитела к HBs-антигену, происходит нейтрализация HBsAg, что в конечном итоге приводит к уменьшению степени окраски (подавлению сигнала) в лунках на последней стадии ИФА. Если % подавления сигнала 50% и более, то исследуемый образец считают положительным. Таким образом, для подтверждения присутствия HBsAg исследуемые образцы анализируют попарно – в прямом ИФА (без добавления подтверждающего агента) и в конкурентном ИФА (с добавлением подтверждающего агента).

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), содержащий рекомбинантный HBsAg, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- слабоположительный контрольный образец ($K^+_{\text{слаб}}$), содержащий рекомбинантный HBsAg в концентрации $(0,04 \pm 0,02)$ МЕ/мл, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-), не содержащий HBsAg, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат № 1, концентрат – биотинилированные поликлональные антитела к HBsAg – 1 флакон (0,8 мл);
- конъюгат № 2, концентрат – конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена – 1 флакон (1,5 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата №1 (РПК №1) – 1 флакон (7,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата №2 (РПК №2) – 1 флакон (13,0 мл);
- раствор подтверждающего агента (РПА) – 1 флакон (3,0 мл);

- раствор для разведения образцов (РРО) – 1 флакон (21,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагентов – 4 шт.;
- наконечниками для пипеток на 4–200 мкл – 32 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность: минимальная концентрация HBsAg, определяемая по стандартному образцу предприятия, содержащему HBsAg (рег. № 05-2-433), аттестованному ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», составляет 0,01 МЕ/мл.

3.2. Специфичность: по результатам анализа сывороток стандартной панели предприятия, не содержащих HBsAg (рег. № 05-2-104), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», составляет 100%.

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 клиничко-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 по-

мещениях, 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

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;
- холодильник бытовой;
- термостатируемый шейкер орбитального типа на 700–800 об/мин, поддерживающий температуру $(42 \pm 1)^\circ C$ либо $(37 \pm 1)^\circ C$;
- автоматический промыватель для планшетов;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей до 350 мкл;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл, 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл, 2000 мл;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки (плазмы) крови. После размораживания образцы тщательно перемешать.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре

мещениях, 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

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;

– холодильник бытовой;

– термостатируемый шейкер орбитального типа на 700–800 об/мин, поддерживающий температуру $(42 \pm 1)^\circ\text{C}$ либо $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

– автоматический промыватель для планшетов;

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

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей до 350 мкл;

– перчатки резиновые хирургические;

– бумага фильтровальная лабораторная;

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

– колба вместимостью 1000 мл, 2000 мл;

– вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки (плазмы) крови. После размораживания образцы тщательно перемешать.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие взвешенные частицы, 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 работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °С в течение времени не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. 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 от 30 до 40 °С 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 °С не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного, слабоположительного и отрицательного контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

Приготовление рабочего раствора конъюгата № 1.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата № 1 и добавить необходимое количество концентрата конъюгата №1, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата № 2.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата № 2 и добавить необходимое количество концентрата конъюгата № 2, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С.

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество концентрата тетраметилбензидина и добавить необходимое количество субстратного буферного раствора, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

Таблица расхода компонентов набора

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата № 1		Рабочий раствор конъюгата № 2		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Промывочный раствор	
	Конъюгат № 1, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 1, мл	Конъюгат № 2, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 2, мл	Концентрат тетраметилбензидина, мкл	Субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Вода дистиллированная, мл
2	100	1,0	200	2,0	100	2,0	4,0	до 100
4	200	2,0	400	4,0	200	4,0	8,0	до 200
6	300	3,0	600	6,0	300	6,0	12,0	до 300
8	400	4,0	800	8,0	400	8,0	16,0	до 400
10	500	5,0	1000	10,0	500	10,0	20,0	до 500
12	600	6,0	1200	12,0	600	12,0	24,0	до 600

7.9. Внесение контрольных и исследуемых образцов.

7.9.1. Контрольные и анализируемые образцы вносить в дублях в лунки двух стрипов – одна лунка используется для постановки прямого ИФА (с добавлением РРО, не содержащего нейтрализующих HBsAg антител), вторая – для конкурентного ИФА (с добавлением РПА, содержащего нейтрализующие HBsAg антитела). Соответственно, стрипы следует использовать попарно – один для постановки прямого, другой – для конкурентного ИФА.

7.9.2. Во все лунки стрипов для прямого ИФА (например, с нечетными номерами) внести по 50 мкл РРО, а во все лунки стрипов для конкурентного ИФА (например, с четными номерами) – по 50 мкл РПА.

7.9.3. Внести по 100 мкл контрольных образцов в лунки стрипов для прямого и конкурентного ИФА:

- 2 лунки – по 100 мкл K⁺;

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С.

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество концентрата тетраметилбензидина и добавить необходимое количество субстратного буферного раствора, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

Таблица расхода компонентов набора

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата № 1		Рабочий раствор конъюгата № 2		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Промывочный раствор	
	Конъюгат № 1, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 1, мл	Конъюгат № 2, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 2, мл	Концентрат тетраметилбензидина, мкл	Субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Вода дистиллированная, мл
2	100	1,0	200	2,0	100	2,0	4,0	до 100
4	200	2,0	400	4,0	200	4,0	8,0	до 200
6	300	3,0	600	6,0	300	6,0	12,0	до 300
8	400	4,0	800	8,0	400	8,0	16,0	до 400
10	500	5,0	1000	10,0	500	10,0	20,0	до 500
12	600	6,0	1200	12,0	600	12,0	24,0	до 600

7.9. Внесение контрольных и исследуемых образцов.

7.9.1. Контрольные и анализируемые образцы вносить в дублях в лунки двух стрипов – одна лунка используется для постановки прямого ИФА (с добавлением РРО, не содержащего нейтрализующих HBsAg антител), вторая – для конкурентного ИФА (с добавлением РПА, содержащего нейтрализующие HBsAg антитела). Соответственно, стрипы следует использовать попарно – один для постановки прямого, другой – для конкурентного ИФА.

7.9.2. Во все лунки стрипов для прямого ИФА (например, с нечетными номерами) внести по 50 мкл РРО, а во все лунки стрипов для конкурентного ИФА (например, с четными номерами) – по 50 мкл РПА.

7.9.3. Внести по 100 мкл контрольных образцов в лунки стрипов для прямого и конкурентного ИФА:

- 2 лунки – по 100 мкл K⁺;

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 20.10.2007 г. № 3979-Пр/07



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2007 г.

М.П.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного подтверждения присутствия
HBs-антигена вируса гепатита В (HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ (далее по тексту – набор) предназначен для подтверждения присутствия HBs-антигена вируса гепатита В методом конкурентного иммуноферментного анализа, основанного на принципе нейтрализации HBsAg специфическими антителами. Положительный результат, полученный в постановке любого комплекта набора реагентов HBsAg-ИФА-БЕСТ, должен быть подтвержден в реакции нейтрализации с использованием набора HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ. Минимальная концентрация HBsAg, выявляемая с помощью данного набора, составляет по отраслевому стандартному образцу HBsAg (ОСО 42-28-311-06П) - 0,01 МЕ/мл.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 41 неизвестного образца, 7 контрольных образцов, всего 48 определений при использовании всего планшета. Для исследования небольшой партии проб предусмотрено использование 2 стрипов по 8 анализов (4 контрольных образцов и 4 неизвестных образцов).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации при добавлении в лунки планшета исследуемого образца и биотинилированных поликлональных антител происходит связывание моноклональных антител, иммобилизованных на внутренней поверхности лунок, и биотинилированных

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. Директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым и зав.лабораторией И.Н. Кувшиновой

поликлональных антител с HBsAg в анализируемом образце. Во время второй инкубации стрептавидин, меченый пероксидазой, связывается с биотинилированными поликлональными антителами к HBsAg, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Во время третьей инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы антиген-антитело. Степень окраски пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых пробах. Если во время первой инкубации в лунки дополнительно добавляется раствор подтверждающего агента, содержащий антитела к HBs-антигену, происходит нейтрализация HBsAg, что в конечном итоге приводит к уменьшению степени окраски (подавлению сигнала) в лунках на последней стадии ИФА. Если степень подавления сигнала 50% и более, то исследуемый образец считают положительным. Таким образом, для подтверждения присутствия HBsAg исследуемые образцы анализируют попарно – в прямом ИФА (без добавления подтверждающего агента) и в конкурентном ИФА (с добавлением подтверждающего агента).

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.;
- положительный контрольный образец (K+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий рекомбинантный HBsAg в концентрации $(1,0 \pm 0,5)$ ME/мл, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- слабоположительный контрольный образец (K+слаб) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий рекомбинантный HBsAg в концентрации $(0,05 \pm 0,02)$ ME/мл, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий HBsAg, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат № 1, концентрат - биотинилированные поликлональные антитела к HBsAg – 1 флакон (1,0 мл);
- конъюгат № 2, концентрат – конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена - 1 флакон (1,5 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (40 мл);
- раствор для разведения конъюгата №1 – 1 флакон (7,0 мл);

- раствор для разведения конъюгата №2 – 1 флакон (13 мл);
- раствор подтверждающего агента – 1 флакон (3,0) мл;
- раствор для разведения образцов – 1 флакон (21,0) мл;
- субстратный буферный раствор – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл);
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночка для реагентов – 3 шт.;
- наконечники для пипетки на 4–200 мкл – 24 шт.;

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления HBsAg при проверке на панели сывороток, не содержащих HBsAg (СОП-06-20), - 100%.

3.2. Чувствительность – минимальная концентрация HBsAg, определяемая набором по ОСО 42-28-311-06П, - 0,01 МЕ/мл.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором 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.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любые другие возбудители вирусных и бактериальных инфекций.

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

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

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

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в инфракрасном режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм;

– автоматический или ручной промыватель для планшетов любого типа;

– холодильник бытовой;

– шейкер орбитального типа на 700–800 об/мин, либо суховоздушный термостат поддерживающие температуру $(42 \pm 1)^{\circ}\text{C}$;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей до 350 мкл;

– перчатки резиновые хирургические;

– бумага фильтровальная лабораторная;

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

– колба вместимостью 1000 мл, 2000 мл;

– вода дистиллированная;

– 6% раствор перекиси водорода.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Образцы крови у обследуемых лиц в количестве не менее 1 мл отбирают из вены. Сыворотку крови тщательно отделяют от сгустка и примеси эритроцитов. Допускается хранение сывороток при температуре от 2 до 8 °C в течение 5 суток, либо при температуре минус 20 °C не более 3 месяцев. Не рекомендуется оттаивание и замораживание образцов более одного раза.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при комнатной температуре (18-25) °C в течение 60 мин.

7.2. Подготовка планшета

Цефленовый пакет с планшетом вскрыть со стороны замка, отступив примерно 1 см. Для проведения ИФА отобрать необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы сразу упаковывать в цефленовый пакет с влагопоглотителем, плотно закрыть застежку. Стрипы стабильны после первого вскрытия пакета в течение всего срока годности набора; хранить при (2–8)°C.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора

При выпадении осадка солей в 25-кратном концентрате фосфатно-солевого буферного раствора с твином необходимо прогреть его при температуре 30-40°C до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) внести в мерный цилиндр необходимое количество 25-кратного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре (2-8)°C не более 3 суток.

7.4. Подготовка контрольных образцов

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

После отбора части содержимого контрольные образцы можно хранить при температуре (2-8)°C в течении всего срока годности.

7.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата № 1

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в пластиковую емкость, входящую в состав набора, внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата № 1 и добавить необходимое количество концентрата конъюгата №1, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от (18-25)°C.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата № 2

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в пластиковую емкость, входящую в состав набора, внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата № 2 и добавить необходимое количество концентрата конъюгата № 2, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от (18-25)°C.

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в пластиковую емкость, входящую в состав набора, внести необходимое количество концентрата тетраметилбензидина и добавить необходимое количество субстратного буферного раствора, тщательно перемешать.

Хранить до 3 ч при температуре от (18-25)°С в защищенном от света месте.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

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

Таблица расхода компонентов набора

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата № 1		Рабочий раствор конъюгата № 2		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Рабочий промывочный раствор	
	Конъюгат № 1, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 1, мл	Конъюгат № 2, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 2, мл	Концентрат тетраметилбензидина, мкл	субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Вода дистиллированная, мл
2	100	1,0	200	2,0	140	2,0	6,0	До 150
4	200	2,0	400	4,0	280	4,0	12,0	До 300
6	300	3,0	600	6,0	420	6,0	18,0	До 450
8	400	4,0	800	8,0	560	8,0	27,0	До 675
10	500	5,0	1000	10,0	700	10,0	33,0	До 825
12	600	6,0	1200	12,0	840	12,0	40,0	До 1000

7.9. Внесение контрольных и исследуемых образцов

Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Контрольные и анализируемые образцы вносить в дублях в лунки двух стрипов – одна лунка используется для постановки прямого ИФА (с добавлением раствора для разведения образцов, не содержащего нейтрализующих HBsAg антител), вторая – для конкурентного ИФА (с добавлением раствора подтверждающего агента, содержащего нейтрализующие HBsAg антитела). Соответственно, стрипы используют попарно – один для постановки прямого, другой – для конкурентного ИФА.

Для внесения контрольных образцов рекомендуется следующая схема:

при использовании

- 2 стрипов – 1 лунка К+ (в дублях), 1 лунка К+слаб (в дублях), 2 лунки К- (в дублях);

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидаина

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в пластиковую емкость, входящую в состав набора, внести необходимое количество концентрата тетраметилбензидаина и добавить необходимое количество субстратного буферного раствора, тщательно перемешать.

Хранить до 3 ч при температуре от (18-25)°С в защищенном от света месте.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

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

Таблица расхода компонентов набора

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата № 1		Рабочий раствор конъюгата № 2		Рабочий раствор тетраметилбензидаина		Рабочий промывочный раствор	
	Конъюгат № 1, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 1, мл	Конъюгат № 2, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 2, мл	Концентрат тетраметилбензидаина, мкл	субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Вода дистиллированная, мл
2	100	1,0	200	2,0	140	2,0	6,0	До 150
4	200	2,0	400	4,0	280	4,0	12,0	До 300
6	300	3,0	600	6,0	420	6,0	18,0	До 450
8	400	4,0	800	8,0	560	8,0	27,0	До 675
10	500	5,0	1000	10,0	700	10,0	33,0	До 825
12	600	6,0	1200	12,0	840	12,0	40,0	До 1000

7.9. Внесение контрольных и исследуемых образцов

Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Контрольные и анализируемые образцы вносить в дублях в лунки двух стрипов – одна лунка используется для постановки прямого ИФА (с добавлением раствора для разведения образцов, не содержащего нейтрализующих HBsAg антител), вторая – для конкурентного ИФА (с добавлением раствора подтверждающего агента, содержащего нейтрализующие HBsAg антитела). Соответственно, стрипы используют попарно – один для постановки прямого, другой – для конкурентного ИФА.

Для внесения контрольных образцов рекомендуется следующая схема:
при использовании

- 2 стрипов – 1 лунка К+ (в дублях), 1 лунка К+слаб (в дублях), 2 лунки К- (в дублях);

- 4 стрипов - 1 лунка К+ (в дублях), 1 лунка К+слаб (в дублях), 3 лунки К--(в дублях);
- 6 стрипов и более - 2 лунки К+ (в дублях), 2 лунки К+слаб (в дублях), 3 лунки К- (в дублях);

7.10. Во все лунки стрипов для прямого ИФА (например, с нечётными номерами) внести по 50 мкл раствора для разведения образцов, а во все лунки стрипов для конкурентного ИФА (например, с чётными номерами) – по 50 мкл раствора подтверждающего агента.

7.11. Внести по 100 мкл контрольных и исследуемых образцов одновременно в лунки стрипов для прямого и конкурентного ИФА. Например, в лунки А-1 и А-2, В-1 и В-2, С-1 и С-2 внести по 100 мкл К–, в лунки D-1 и D-2, Е-1 и Е-2 – по 100 мкл К+слаб, в лунки F-1 и F-2, G-1 и G-2 – по 100 мкл К+, в остальные лунки попарно – по 100 мкл исследуемых образцов.

7.12. Внести во все лунки по 50 мкл рабочего раствора конъюгата № 1 (см. п. 7.5.) – **не касаясь наконечниками содержимого лунок и стенок лунок!** Для внесения раствора конъюгата №1 использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.13. Отрезать пленку требуемого размера. Закрыть лунки планшета, плотно прижав пленку. Инкубировать 40 мин при $(42\pm 1)^{\circ}\text{C}$ на шейкере. Оптимальный режим встряхивания для шейкеров орбитального типа 700–800 об/мин.

Допускается инкубация в термостате при $(42\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 1 ч 30 мин.

7.14. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором (6% раствор перекиси водорода) и промыть, добавляя во все лунки **не менее 400 мкл** рабочего промывочного раствора (см. п. 7.3). Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Процесс промывки повторить 5 раз. **Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки.** После этого лунки промыть 2 раза дистиллированной водой. Воду из лунок тщательно удалить, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Примечание: Автоматическую промывку рекомендуется проводить в режиме с переполнением (в программе соответствующего автоматического вошера следует установить параметр «Overflow» с 5-ю циклами промывки и внесением в лунки по 600-700 мкл рабочего промывочного раствора).

7.15. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата № 2 (см п. 7.5.), заклеить планшет пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $(42\pm 1)^{\circ}\text{C}$ на

шейкере орбитального типа при 700–800 об/мин.

Допускается инкубация в термостате при $(42 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин.

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

7.16. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз, как указано в п. 7.14.

7.17. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.6) и инкубировать в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре ($18-25^\circ\text{C}$).

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

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм – 650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить сразу после остановки реакции.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом отдельно для прямого ИФА ($\text{ОП}_{\text{ср}}\text{K}^-_{\text{прям}}$) и для конкурентного ИФА ($\text{ОП}_{\text{ср}}\text{K}^-_{\text{конк}}$). $\text{ОП}_{\text{ср}}\text{K}^-_{\text{прям}}$ в дальнейшем используется для подсчета $\text{ОП}_{\text{крит}}$.

9.2. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом в прямом ИФА не должно превышать 0,1 ед. опт. плотн. при использовании двухволнового режима измерения и не превышать 0,15 ед. опт. плотн. при измерении на одной длине волны. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом в конкурентном ИФА должно быть ниже $\text{ОП}_{\text{крит}}$.

9.3. Вычислить критическое значение оптической плотности ($\text{ОП}_{\text{крит}}$) по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}} (\text{K}^-_{\text{прям}}) + 0,05$$

где $\text{ОП}_{\text{ср}} (\text{K}^-_{\text{прям}})$ - среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом в прямом ИФА.

9.4. Значение оптической плотности в лунках с положительным контрольным образцом

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«06» _____ 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного подтверждения
присутствия HBs-антигена вируса гепатита В
«HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ (далее по тексту – набор) предназначен для подтверждения присутствия HBs-антигена вируса гепатита В методом конкурентного иммуноферментного анализа, основанного на принципе нейтрализации HBsAg специфическими антителами. Положительный результат, полученный в постановке любого комплекта набора реагентов HBsAg-ИФА-БЕСТ, должен быть подтвержден в реакции нейтрализации с использованием набора HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ. Минимальная концентрация HBsAg, выявляемая с помощью данного набора, составляет по стандартному образцу предприятия, содержащему HBsAg (рег. № 05-2-433), аттестованному ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», 0,01 МЕ/мл.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 44 неизвестных образца, 4 контрольных образцов, всего 48 определений при использовании всего планшета. Для исследования небольшой партии проб предусмотрено использование 2 стрипов по 8 анализов (4 контрольных образцов и 4 неизвестных образцов).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации при добавлении в лунки планшета исследуемого образца и биотинилиро-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым и зав. лабораторией И.Н. Кувишиновой

24

ванных поликлональных антител происходит связывание моноклональных антител, иммобилизованных на внутренней поверхности лунок, и биотинилированных поликлональных антител с HBsAg в анализируемом образце. Во время второй инкубации стрептавидин, меченный пероксидазой, связывается с биотинилированными поликлональными антителами к HBsAg, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Во время третьей инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы антиген-антитело. Степень окраски пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых пробах. Если во время первой инкубации в лунки дополнительно добавляется раствор подтверждающего агента, содержащий антитела к HBs-антигену, происходит нейтрализация HBsAg, что в конечном итоге приводит к уменьшению степени окраски (подавлению сигнала) в лунках на последней стадии ИФА. Если % подавления сигнала 50% и более, то исследуемый образец считают положительным. Таким образом, для подтверждения присутствия HBsAg исследуемые образцы анализируют попарно – в прямом ИФА (без добавления подтверждающего агента) и в конкурентном ИФА (с добавлением подтверждающего агента).

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), содержащий рекомбинантный HBsAg, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- слабоположительный контрольный образец ($K^+_{слаб}$), содержащий рекомбинантный HBsAg в концентрации $(0,04 \pm 0,02)$ МЕ/мл, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-), не содержащий HBsAg, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат № 1, концентрат – биотинилированные поликлональные антитела к HBsAg – 1 флакон (0,8 мл);
- конъюгат № 2, концентрат – конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена – 1 флакон (1,5 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата №1 (РПК №1) – 1 флакон (7,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата №2 (РПК №2) – 1 флакон (13,0 мл);
- раствор подтверждающего агента (РПА) – 1 флакон (3,0 мл);

- раствор для разведения образцов (РРО) – 1 флакон (21,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагентов – 4 шт.;
- наконечниками для пипеток на 4–200 мкл – 32 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность: минимальная концентрация HBsAg, определяемая по стандартному образцу предприятия, содержащему HBsAg (рег. № 05-2-433), аттестованному ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», составляет 0,01 МЕ/мл.

3.2. Специфичность: по результатам анализа сывороток стандартной панели предприятия, не содержащих HBsAg (рег. № 05-2-104), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», составляет 100%.

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 клиничко-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 по-

мещениях, 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

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;

– холодильник бытовой;

– термостатируемый шейкер орбитального типа на 700–800 об/мин, поддерживающий температуру $(42 \pm 1)^\circ\text{C}$ либо $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

– автоматический промыватель для планшетов;

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

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей до 350 мкл;

– перчатки резиновые хирургические;

– бумага фильтровальная лабораторная;

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

– колба вместимостью 1000 мл, 2000 мл;

– вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки (плазмы) крови. После размораживания образцы тщательно перемешать.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие взвешенные частицы, 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 работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °С в течение времени не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. 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 от 30 до 40 °С 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 °С не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного, слабоположительного и отрицательного контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

Приготовление рабочего раствора конъюгата № 1.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата № 1 и добавить необходимое количество концентрата конъюгата №1, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата № 2.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата № 2 и добавить необходимое количество концентрата конъюгата № 2, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С.

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество концентрата тетраметилбензидина и добавить необходимое количество субстратного буферного раствора, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

Таблица расхода компонентов набора

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата № 1		Рабочий раствор конъюгата № 2		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Промывочный раствор	
	Конъюгат № 1, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 1, мл	Конъюгат № 2, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 2, мл	Концентрат тетраметилбензидина, мкл	Субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Вода дистиллированная, мл
2	100	1,0	200	2,0	100	2,0	4,0	до 100
4	200	2,0	400	4,0	200	4,0	8,0	до 200
6	300	3,0	600	6,0	300	6,0	12,0	до 300
8	400	4,0	800	8,0	400	8,0	16,0	до 400
10	500	5,0	1000	10,0	500	10,0	20,0	до 500
12	600	6,0	1200	12,0	600	12,0	24,0	до 600

7.9. Внесение контрольных и исследуемых образцов.

7.9.1. Контрольные и анализируемые образцы вносить в дублиях в лунки двух стрипов – одна лунка используется для постановки прямого ИФА (с добавлением РРО, не содержащего нейтрализующих HBsAg антител), вторая – для конкурентного ИФА (с добавлением РПА, содержащего нейтрализующие HBsAg антитела). Соответственно, стрипы следует использовать попарно – один для постановки прямого, другой – для конкурентного ИФА.

7.9.2. Во все лунки стрипов для прямого ИФА (например, с нечетными номерами) внести по 50 мкл РРО, а во все лунки стрипов для конкурентного ИФА (например, с четными номерами) – по 50 мкл РПА.

7.9.3. Внести по 100 мкл контрольных образцов в лунки стрипов для прямого и конкурентного ИФА:

- 2 лунки – по 100 мкл K^{+} ;

- 2 лунки – по 100 мкл $K^{+}_{слаб.}$;
- 4 лунки – по 100 мкл K^{-} .

Внести в остальные лунки попарно по 100 мкл исследуемых образцов.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение 5-7 мин.

7.10. Во все лунки планшета внести по 50 мкл рабочего раствора конъюгата №1 (п. 7.5).

Для внесения рабочего раствора конъюгата №1 использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

7.11. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостатируемом шейкере: 40 мин при 42 °С или 60 мин при 37 °С с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

7.12. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть с помощью промывочного устройства, добавляя во все лунки по 400 мкл рабочего промывочного раствора (см п. 7.3) в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Общее число промывок равно 5. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмытки. Остатки раствора из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

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

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

7.14. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостатируемом шейкере: 30 мин при 42 °С или 30 мин при 37 °С с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

7.15. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет как указано в п.7.12.

7.16. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (см п. 7.7).

Для внесения рабочего раствора ТМБ использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

Планшет инкубировать в защищенном от света месте в течение 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 655 нм; допускается измерение оптической плотности на одной длине волны – 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень осу-

шествлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 5 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср}K^-$).

9.2. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом не должно превышать 0,15 ед. опт. плотн.

9.3. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,05$$

9.4. Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом для прямого ИФА должно быть не менее 1,0 ед. опт. плотн.; % подавления сигнала в конкурентном ИФА должен составлять 50% и более.

9.5. Значение оптической плотности в лунке со слабоположительным контрольным образцом для прямого ИФА должно быть больше $ОП_{крит}$; % подавления сигнала в конкурентном ИФА должен составлять 50% и более.

9.6. Результат анализа считают отрицательным если $ОП_{обр} < ОП_{крит}$.

где: $ОП_{обр}$ – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом сыворотки (плазмы) крови.

9.7. Если ОП анализируемого образца в прямом ИФА $\geq ОП_{крит}$, следует вычислить % подавления сигнала в конкурентном ИФА по формуле:

$$\% \text{ подавления} = \frac{ОП_{прям} - ОП_{конк}}{ОП_{прям} - ОП_{ср}(K^-)} \times 100\%$$

где: $ОП_{прям}$ – оптическая плотность анализируемых образцов в лунках для прямого ИФА, а $ОП_{конк}$ – оптическая плотность анализируемых образцов в лунках для конкурентного ИФА.

9.8. Если $ОП_{обр}$ в прямом ИФА равно или превышает $ОП_{крит}$, а % подавления сигнала 50% и более, то исследуемый образец признают положительным, содержащим HBsAg (результат подтверждается).

9.9. Если $ОП_{обр}$ в прямом ИФА больше либо равна $ОП_{крит}$, а в конкурентном ИФА % подавления сигнала менее 50%, то исследуемый образец следует развести последовательно в 400 и 4000 раз раствором для разведения образцов (РРО) и повторить анализ.

9.10. Если после разведения образца $ОП_{обр}$ в прямом ИФА превышает или равна $ОП_{крит}$, и % подавления сигнала в конкурентном ИФА 50% и более, то образец признают по-

шествовать по воздуху). Измерение проводить не позднее 5 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср}K^-$).

9.2. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом не должно превышать 0,15 ед. опт. плотн.

9.3. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}(K^-) + 0,05$$

9.4. Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом для прямого ИФА должно быть не менее 1,0 ед. опт. плотн.; % подавления сигнала в конкурентном ИФА должен составлять 50% и более.

9.5. Значение оптической плотности в лунке со слабopоложительным контрольным образцом для прямого ИФА должно быть больше $ОП_{крит}$; % подавления сигнала в конкурентном ИФА должен составлять 50% и более.

9.6. Результат анализа считают отрицательным если $ОП_{обр} < ОП_{крит}$.

где: $ОП_{обр}$ – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом сыворотки (плазмы) крови.

9.7. Если ОП анализируемого образца в прямом ИФА $\geq ОП_{крит}$, следует вычислить % подавления сигнала в конкурентном ИФА по формуле:

$$\% \text{ подавления} = \frac{ОП_{прям} - ОП_{конк}}{ОП_{прям} - ОП_{ср}(K^-)} \times 100\%$$

где: $ОП_{прям}$ – оптическая плотность анализируемых образцов в лунках для прямого ИФА, а $ОП_{конк}$ – оптическая плотность анализируемых образцов в лунках для конкурентного ИФА.

9.8. Если $ОП_{обр}$ в прямом ИФА равно или превышает $ОП_{крит}$, а % подавления сигнала 50% и более, то исследуемый образец признают положительным, содержащим HBsAg (результат подтверждается).

9.9. Если $ОП_{обр}$ в прямом ИФА больше либо равна $ОП_{крит}$, а в конкурентном ИФА % подавления сигнала менее 50%, то исследуемый образец следует развести последовательно в 400 и 4000 раз раствором для разведения образцов (РРО) и повторить анализ.

9.10. Если после разведения образца $ОП_{обр}$ в прямом ИФА превышает или равна $ОП_{крит}$ и % подавления сигнала в конкурентном ИФА 50% и более, то образец признают по-

ции по применению набора.

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

По вопросам, касающимся качества набора «HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ», 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. лабораторией маркеров
вирусных инфекций НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

И.Н Кувшинова

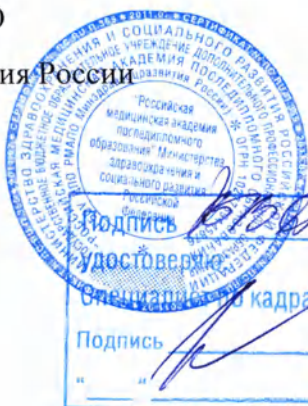
Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»

зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО

Минздравсоцразвития России



д.м.н., профессор В.В. Долгов
«22» 02 2012 г.