

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

по применению набора реагентов для иммуноферментного
качественного и количественного определения антител
к HBs-антигену вируса гепатита В в сыворотке (плазме) крови
«ВектоHBsAg-антитела»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВектоHBsAg-антитела (далее по тексту – набор) предназначен для качественного и количественного определения антител к HBs-антигену вируса гепатита В (анти-HBsAg) в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. При использовании всего планшета набор рассчитан на проведение анализа 86 неизвестных и 5 калибровочных образцов в дублях – всего 96 определений (количественный вариант); либо 91 неизвестных и 5 калибровочных образцов – всего 96 определений (качественный вариант).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения антител к HBs-антигену основан на двухстадийном твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации происходит связывание специфических антител, содержащихся в исследуемых образцах, с иммобилизованным на поверхности лунок стрипов рекомбинантным HBs-антигеном с образованием комплекса «антиген-антитело», который выявляют с помощью конъюгата рекомбинантного HBsAg с пероксидазой хрена во время второй инкубации. Во время третьей инкубации с раствором тет-

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

раметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы антиген-антитело. Степень окраски пропорциональна концентрации специфических антител в анализируемых образцах.

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

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок рекомбинантным HBsAg субтипов ау и ад, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочный образец, не содержащий анти-HBsAg: 0 мМЕ/мл, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл);
- калибровочные образцы, содержащие анти-HBsAg, аттестованные относительно WHO International Standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin, human NIBSC code: 07/164: 10 мМЕ/мл; 100 мМЕ/мл; 400 мМЕ/мл; 1000 мМЕ/мл – готовые для использования – 4 флакона по 1,3 мл;
- конъюгат – рекомбинантный HBsAg, конъюгированный с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночкой для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 4 – 200 мкл – 16 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфическая активность.

3.1.1. Специфичность: по результатам анализа сывороток стандартной панели предприятия, не содержащих антитела к HBsAg (рег. № 05-2-179), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», составляет 100%.

3.1.2. Чувствительность: по результатам анализа сывороток стандартной панели пред-

приятия, содержащих антитела к HBsAg (рег. № 05-2-179), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», составляет 100%.

3.2 Воспроизводимость. Коэффициент вариации по результатам определения содержания антител к HBsAg в одном и том же образце с использованием набора ВектоHBsAg-антитела не превышает 8%.

3.3 Линейность Зависимость концентрации антител к HBsAg имеет линейный характер в диапазоне от 10 до 1000 мМЕ/мл и составляет $\pm 10\%$.

3.4 Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» антител к HBsAg - соответствие измеренной концентрации антител к HBsAg предписанной в образце, полученном путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного раствора 10 мМЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5 Аналитическая чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация антител к HBsAg не превышает 2 мМЕ/мл.

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 клинко-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 кон-

трольными 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 °C;

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 гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 сут или при температуре минус 20°C (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 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа 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 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Подготовка калибровочных образцов

Калибровочные образцы готовы к использованию.

Перед проведением анализа флаконы с калибровочными образцами встряхнуть.

Калибровочные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С 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 °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 сут.

Таблица

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистилли- рованная вода, мл		
1	2	до 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.5. Подготовка конъюгата.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Конъюгат хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ плюс.

Раствор ТМБ плюс хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.7. Внесение контрольных и исследуемых образцов.

Для постановки **качественного** варианта анализа в лунку А-1, В-1 внести по 100 мкл калибровочного образца 0 мМЕ/мл, в лунки С-1, D-1-100 мкл калибровочного образца 10 мМЕ/мл, в лунку Е-1-100 мкл калибровочного образца 400 мМЕ/мл.

В остальные лунки внести по 100 мкл цельных исследуемых образцов.

Для постановки **количественного** варианта анализа внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 100 мкл калибровочных образцов 0; 10; 100; 400; 1000 мМЕ/мл. В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых образцов.

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

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

7.9. 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.

7.10. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата. (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые накопники, входящие в состав набора.

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

7.12. По окончании инкубации промыть планшет 5 раз как описано выше (см. п. 7.10).

7.17. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см. п. 7.6) и инкубировать в темноте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °C.

Для внесения раствора ТМБ плюс 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:

– $B_0 \leq 0,05$ ед. опт. плотн., где B_0 – среднее значение оптической плотности в лунках с калибровочным образцом 0 мМЕ/мл;

– $B_{10} > 1,5 \times B_0$, где B_{10} – среднее значение оптической плотности в лунках с калибровочным образцом 10 мМЕ/мл;

– $B_{400} \geq 0,5$ ед. опт. плотн., где B_{400} – значение оптической плотности в лунках с калибровочным образцом 400 мМЕ/мл;

9.2. Результат анализа считать отрицательным, если $B_{обр.} < B_{10}$, где $B_{обр.}$ – оптическая плотность в лунке с исследуемым образцом, B_{10} – среднее значение оптической плотности в лунках с калибровочным образцом 10 мМЕ/мл.

Результат анализа считать положительным, если $B_{обр.} \geq B_{10}$.

9.3. Определение концентрации анти-HBsAg.

9.3.1. Вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с калибровочными образцами. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации анти-HBsAg в калибровочных образцах (мМЕ/мл).

9.3.2. Определить содержание анти-HBsAg в анализируемых образцах по калибровочному графику. Полученную концентрацию анти-HBsAg умножить на фактор разведения.

9.3.3. Если значение ОП анализируемого образца превышает ОП калибровочного образца 1000 мМЕ/мл, следует повторить анализ, разведя образец в 100 раз калибровочным образцом 0 мМЕ/мл (к 495 мкл калибровочного образца 0 мМЕ/мл добавить 5 мкл анализируемого образца). В случае разведения анализируемых образцов необходимо полученную концентрацию анти-НВsAg умножить на фактор разведения.

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 «ВектоНВsAg-антитела» 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 и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- раствор тетраметилбензидина плюс после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- калибровочные образцы, конъюгат 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;

10.4. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

10.5. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток 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-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «ВектоHBsAg-антитела», 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

Ректор ГБОУ ВПО
НГМУ Минздравсоцразвития России



И.О. Маринкин



[Handwritten signature]

Проинформировано, пронумеровано и скреплено печатью
Листов