



« 08 » 08 2006 г.

№ 01-11/153-06

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

«ВектоHBcAg-антитела»

Тест-системы иммуноферментной для выявления суммарных антител к core-антигену вируса гепатита В набор диагностический

Тест-система «ВектоHBcAg-антитела» представляет собой набор реагентов для проведения конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе.

СОСТАВ НАБОРА

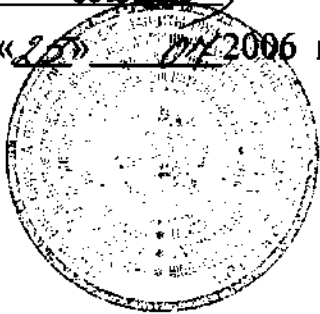
- иммуносорбент – рекомбинантный core-антиген вируса гепатита В (HBcAg), иммобилизованный на разборном планшете для иммунологических реакций;
- положительный контрольный образец (K^+) – инаktivированная сыворотка крови человека, содержащая антитела к HBcAg и не содержащая антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС – прозрачная жидкость красного цвета;
- отрицательный контрольный образец (K^-) – инаktivированная сыворотка крови человека, не содержащая антитела к HBcAg, ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС – прозрачная опалесцирующая жидкость желтого цвета;
- конъюгат, концентрат ($\times 11$) – моноклональные антитела к HBcAg, конъюгированные с пероксидазой хрена – прозрачная жидкость синего цвета;
- фосфатно-солевой буферный раствор с твином, концентрат (ФСБ-Т $\times 25$) – прозрачная жидкость бесцветная или с легкой опалесценцией, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре от 30 до 40 °C в течение 20 мин;
- субстратный буферный раствор (СБР) – прозрачная бесцветная жидкость;
- раствор для разведения конъюгата (РПК) – прозрачная жидкость бесцветная или с легкой опалесценцией;

Взамен инструкции, утвержденной 11.07.2001 г.

**Директор ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича
Роспотребнадзора**

Богданов Н.В. Медуницын

«25» 2006 г.



– тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат ($\times 15$) – прозрачная жидкость бесцветная или бледно-желтого цвета;

– стоп-реагент – прозрачная бесцветная жидкость;

Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли, и комплектуется всеми необходимыми для ИФА реагентами. Возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление суммарных антител к HBsAg в сыворотке (плазме) крови человека.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

При работе с исследуемыми сыворотками следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках; не перемешивать растворы стеклянной пипеткой с помощью рта; все использованные материалы подвергать обработке дезинфицирующим раствором (например, 6 % раствором перекиси водорода).

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5 %.

Для выявления суммарных антител к HBsAg желательно использовать свежевзятые образцы сыворотки (плазмы) крови. Допускается использование образцов, хранившихся при температуре от 2 до 8 °C не более 5 сут., либо при температуре минус (20 ± 3) °C не более 1 мес.

Сыворотки, содержащие осадок, могут дать неправильный результат, поэтому перед постановкой ИФА их следует центрифугировать в течение 10 - 15 мин при 3000 об/мин для удаления осадка.

Нельзя использовать сыворотки с признаками микробной контаминации или гиперлипидные.

Перед постановкой реакции все компоненты тест-системы, в том числе невскрытую упаковку с планшетом, выдерживают не менее 60 мин при температуре от 18 до 25 °C.

После постановки реакции плотно закрытые флаконы с оставшимися исходными компонентами допускается хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

Раствор ТМБ и раствор конъюгата в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием. Следует исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

При промывке планшета в лунки следует вносить не менее 300 мкл промывочного раствора и не касаться краев лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно составлять не менее 30 с.

При автоматическом промывании планшета необходимо следить за состоянием емкости с промывочным раствором и соединительных шлангов, не допуская образования в них микробных заростов. Для этого раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70 % этиловым спиртом.

Нельзя допускать высыхания лунок между отдельными операциями.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов.

Запрещается многократное использование планшета для предварительного нанесения сывороток.

Наконечники для пипеток, использованные для работы с исследуемыми и контрольными образцами, следует обеззараживать 6 % перекисью водорода в течение 6 ч (другие дезинфицирующие растворы не использовать!). При необходимости повторного использования, наконечники следует промыть 10 раз проточной водой, 3 раза дистиллированной водой и прокипятить в течение 40 мин в последней порции дистиллированной воды, чтобы избавиться от следов перекиси.

Посуду (пластиковые ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с остальными реагентами, не следует обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, т.к. они не содержат инфекционного агента. В случае повторного использования посуду (пластиковые ванночки), наконечники для пипеток промывают проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

Для работы с раствором ТМБ рекомендуется выделить отдельную посуду (пластиковые ванночки) и наконечники для пипеток. Их нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, которые в следовых количествах могут вызывать неконтролируемое разложение ТМБ в ходе реакции. После работы необходимо сразу промыть посуду 50 % раствором этилового спирта, а затем - дистиллированной водой.

Пипетки и рабочие поверхности следует обрабатывать только 70 % раствором этилового спирта. Нельзя использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

При работе со стоп-реагентом следует избегать его попадания на открытые участки тела и одежду.

1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ И РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИФА

1.1 Планшет

Упаковка с планшетом перед вскрытием должна быть выдержана в течение 60 мин при температуре от 18 до 25 °С для предотвращения конденсации влаги на стрипах.

Цефленовый пакет вскрывают на 1 см выше замка. Для проведения ИФА отбирают необходимое количество стрипов и закрепляют их в рамке планшета, оставшиеся неиспользуемые стрипы снимают с рамки и сразу плотно упаковывают в цефленовый пакет с осушителем, удаляют из него воздух и плотно закрывают на замок.

Хранение: после первого вскрытия цефленового пакета в течение 4 нед. при температуре от 2 до 8 °С.

1.2 Раствор для отмывки планшета (ФСБ-Т)

Содержимое флакона с концентратом ФСБ-Т×25 взбалтывают и, при наличии осадка солей, прогревают при температуре от 37 до 40 °С до полного растворения осадка; после чего разводят дистиллированной водой до 700 мл.

Хранение: в течение 4 нед. при температуре от 2 до 8 °С.

1.3 Контрольные образцы

Положительный и отрицательный контрольные образцы (K^+ и K^-) готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Хранение: после первого вскрытия флакона в течение 4 нед. при температуре

от 2 до 8 °C.

1.4 Рабочий раствор конъюгата

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов тест-системы), в чистый флакон вносят необходимое количество раствора для разведения конъюгата (РРК), добавляют соответствующее количество исходного концентрата конъюгата, тщательно перемешивают.

Хранение: в течение 30 мин при температуре от 18 до 25 °C.

1.5 Раствор ТМБ

(готовят непосредственно перед использованием)

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в чистый флакон вносят необходимое количество субстратного буферного раствора (СБР), добавляют соответствующее количество исходного концентрата ТМБ, тщательно перемешивают.

Хранение: в течение 20 мин при температуре от 18 до 25 °C в защищенном от света месте.

Внимание: При приготовлении раствора ТМБ следует исключить воздействие света, например, обернуть флакон фольгой. Для работы с раствором ТМБ следует использовать отдельные чистые наконечники для пипеток.

Таблица

Расход компонентов тест-системы в зависимости от числа используемых стрипов

Количество одновременно используемых стрипов	Конъюгат, концентрат, мл	РРК, мл	ТМБ, мкл	СБР, мл
1	0,1	1,0	70	1,0
2	0,2	2,0	140	2,0
3	0,3	3,0	210	3,0
4	0,4	4,0	280	4,0
5	0,5	5,0	350	5,0
6	0,6	6,0	420	6,0
7	0,7	7,0	490	7,0
8	0,8	8,0	560	8,0
9	0,9	9,0	630	9,0
10	1,0	10,0	700	10,0
11	1,1	11,0	770	11,0
12	1,2	12,0	840	12,0

2. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (ИФА)

Подготавливают промывочный раствор (п. 1.2), рабочий раствор конъюгата (п. 1.4). Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения. Все растворы и стрипы планшета за 60 мин до проведения анализа должны быть доведены до температуры 18-25 °С.

2.1 Внесение контрольных и исследуемых образцов

В две лунки планшета, например, А-1 и В-1 вносят по 50 мкл К⁺. В три другие лунки, например С-1, D-1 и Е-1 – по 50 мкл К⁻.

Во все остальные лунки вносят по 50 мкл исследуемых образцов.

2.2 Внесение рабочего раствора конъюгата

Во все лунки добавляют по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 1.4).

2.3 Проведение инкубации

Планшет плотно закрывают липкой пленкой и инкубируют в течение 60 мин при температуре 37 °С.

2.4 Промывание планшета

По окончании инкубации липкую пленку снимают с планшета, пленку, а также содержимое лунок удаляют в сосуд с дезинфицирующим раствором (6 % раствор перекиси водорода). Планшет промывают 5 раз раствором для отмывки планшета (п.1.2) с помощью автоматического промывающего устройства или вручную, используя многоканальную пипетку. При этом в каждую лунку вносят не менее 300 мкл раствора. Отработанный ФСБ-Т после промывки планшета также собирают в сосуд с дезинфицирующим раствором. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.

По окончании промывания из лунок тщательно удаляют влагу, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

2.5 Внесение раствора ТМБ

В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл свежеприготовленного раствора ТМБ (п. 1.5). Планшет выдерживают 25 мин при температуре от 18 до 25°С в защищенном от света месте.

2.6 Добавление стоп-реактанта

Реакцию останавливают добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реактанта.

Измерение оптической плотности (ОП) проводят не позднее 5 мин после остановки реакции.

Внимание! Следует избегать попадания стоп-реагента на открытые участки тела и одежду. При попадании – промыть большим количеством воды.

РЕГИСТРАЦИЯ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя ОП в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима также регистрация результатов только с фильтром 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществляют по воздуху.

Результаты исследования учитывают при соблюдении следующих условий:

- среднее значение оптической плотности в лунках с положительным контролем ($ОП_{ср} K^+$) не превышает 0,2;
- отношение среднего значения оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным контролем ($ОП_{ср} K^-$) к ОП положительного контрольного образца ($ОП_{ср} K^+$) составляет не менее 4,0.

Критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) вычисляют по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} K^- / 2$$

Результаты анализа считают положительными, если ОП исследуемого образца не превышает $ОП_{крит}$.

Результаты анализа считают отрицательными, если ОП исследуемого образца выше $ОП_{крит}$.

ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-систему выпускают в наборе из 9 компонентов, упакованном в коробку, включающем:

- | | |
|---|------------------|
| – Иммуносорбент – планшет разборный с иммобилизованным рекомбинантным HBsAg | – 1 шт.; |
| – Положительный контрольный образец (K^+) | – 1 фл., 0,7 мл; |
| – Отрицательный контрольный образец (K^-) | – 1 фл., 1,5 мл; |
| – Конъюгат, концентрат ($\times 11$) | – 1 фл., 1,3 мл; |

- Фосфатно-солевой буферный раствор с твином, концентрат (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28,0 мл;
- Субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 12,0 мл;
- Раствор для разведения конъюгата (РРК) – 1 фл., 12,0 мл;
- Тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат (×15) – 1 фл., 1,0 мл;
- Стоп-реагент – 1 фл., 12,0 мл;

К набору прилагаются:

Пленка для заклеивания планшета – 1 шт.;

Инструкция по применению – 1 экз.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности – 6 мес. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Набор хранят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8 °С в недоступном для детей месте. Замораживание не допускается.

Набор транспортируют в соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8 °С; допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С не более 3 сут. Замораживание не допускается.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для лечебно-профилактических, санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество тест-системы направлять:

в Федеральное государственное учреждение науки **Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича** Роспотребнадзора по адресу: *119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел. 241-39-22;*

в адрес предприятия-изготовителя **ЗАО «Вектор-Бест»** (630559, Новосибирская обл., Новосибирский район, п. Кольцово, АБК, тел./факс (8-383) 336-73-46, e-mail: *vobtk@vector-best.ru.*

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов