

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г. № _____

"УТВЕРЖАЮ"

Президент

" 1 "



С.Г.Марданлы

20__ г.

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
"ИФА-антиHBsAg"**

**Тест-система иммуноферментная для выявления антител к HBs-
антигену вируса гепатита В**

Регистрационное удостоверение № от г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление и определение содержания (в мМЕ/мл) антител к HBsAg в сыворотке (плазме) крови человека, а также препаратах, приготовленных из нее (лейкоцитарный интерферон, иммуноглобулины и т.п.), методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Определение наличия и содержания антител к HBsAg в сыворотке (плазме) крови человека необходимо для мониторинга развития инфекции, предвакцинального скрининга, оценки эффективности вакцинации.

СОСТАВ НАБОРА

Иммуносорбент – рекомбинантный HBsAg субтипов ad и ay, сорбированный на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном.

K⁺₂₀₀ – контрольный положительный образец-200 – сыворотка крови человека, содержащая анти-HBsAg в концентрации 200 мМЕ/мл; прозрачная или слегка опалесцирующая с желтым оттенком различной интенсивности жидкость.

K⁺₁₀₀ – контрольный положительный образец-100 – сыворотка крови человека, содержащая анти-HBsAg в концентрации 100 мМЕ/мл прозрачная или слегка опалесцирующая с желтым оттенком различной интенсивности жидкость.

K⁺₅₀ – контрольный положительный образец-50 – сыворотка крови человека, содержащая анти-HBsAg в концентрации 50 мМЕ/мл; прозрачная или слегка опалесцирующая с желтым оттенком различной интенсивности жидкость.

K⁺₁₀ – контрольный положительный образец-10 – сыворотка крови человека, содержащая анти-HBsAg в концентрации 10 мМЕ/мл; прозрачная или слегка опалесцирующая с желтым оттенком различной интенсивности жидкость.

K⁻ – контрольный отрицательный образец – сыворотка крови человека, не содержащая анти-HBs; прозрачная или слегка опалесцирующая с желтым оттенком различной интенсивности жидкость.

Примечание. K⁺₂₀₀, K⁺₁₀₀, K⁺₅₀, K⁺₁₀, K⁻ инаktivированы прогреванием при температуре 56⁰С в течение 2 ч, содержат мертиолят в конечной концентрации 0,01 % не содержат HBsAg, антител к ВИЧ-1,2, ВГС; контроль проводится с использованием коммерческих тест-систем, разрешенных к применению в РФ.

Конъюгат (концентрат x11) – рекомбинантный HBsAg субтипов ad и ay, меченный пероксидазой хрена; прозрачная бесцветная жидкость.

РРО – раствор для разведения образцов; прозрачная или слегка опалесцирующая с желтоватым оттенком жидкость.

РРК – раствор для разведения конъюгата; прозрачная красного цвета жидкость.

ФСБ-Т(х25) – 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином; прозрачная или слегка опалесцирующая пенящаяся бесцветная жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин.

РИ – раствор индикаторный; прозрачная бесцветная жидкость.

Стоп-реагент; прозрачная бесцветная жидкость

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемом образце антител к HBsAg происходит связывание их с антигеном (рекомбинантный HBsAg субтипов ad и ay) иммуносорбента; образовавшийся комплекс антиген-антитело реагирует с внесенным в реакционную среду раствором конъюгата – рекомбинантного HBsAg субтипов ad и ay, меченного пероксидазой хрена. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело-конъюгат" выявляется в реакции с субстратно-индикаторным раствором, содержащим хромоген – тетраметилбензидин, в результате которой меняется цвет (оптическая плотность) реакционной смеси в лунке планшета; изменение регистрируется спектрофотометрически.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Нативная сыворотка (плазма) крови человека или препараты, приготовленные из нее (лейкоцитарный интерферон, иммуноглобулины и т.п.) объемом не менее 100 мкл. Допустимо использование образцов, содержащих ЭДТА, цитрат натрия, гепарин.

Образцы до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С и 3 мес при температуре минус 20 °С или более низкой. Допускается только однократное замораживание-размораживание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контрольные, при качественном определении и 48 образцов, включая контрольные, при количественном определении. Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов.

Аналитическая чувствительность (минимальное содержание антиHBsAg, определяемое с помощью набора) – 10 мМЕ/мл.

Коэффициенты вариации ОП(K_{200}^{+}) и ОП(K^{-}) в одной постановке и в разных постановках – не более 10 %.

Правильность определения (отклонение содержания антиHBsAg, определенного по калибровочному графику, от значений, полученных при прямом титровании) – не более $\pm 10\%$.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом, строго выполняя требования безопасности при серологических исследованиях материалов, потенциально инфицированных возбудителями I и II групп патогенности (СП 1.32322-08. Санитарные правила "Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности и гельминтами")].

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

"РУЧНАЯ" ПОСТАНОВКА

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин, термостат на 42 °С с влажной камерой, холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

В зависимости от числа используемых стрипов отобрать необходимый объем концентрата и довести его водой очищенной до объема, указанного в табл. 1

Таблица 1

Реагент	Объем реагента, мл, настрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т(х25)	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очи- щенная	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

Приготовление рабочего разведения конъюгата

Готовить перед использованием.

При использовании целого планшета к 10,0 мл РРК добавить 1,0 мл конъюгата, тщательно перемешать.

При дробной постановке использовать соотношения объемов конъюгата и РРК, указанные в табл. 2 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 2

Реагент	Объем реагента, мкл, настрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Конъюгат, мл	0,08	0,16	0,24	0,32	0,4	0,48	0,56	0,64	0,72	0,8	0,88	
РРК, мл	0,8	1,6	2,4	3,2	4,0	4,8	5,6	6,4	7,2	8,0	8,8	

Рабочий раствор конъюгата хранить при температуре 18-25°C в течение 3 часов.

Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, K^{+}_{200} , K^{+}_{100} , K^{+}_{50} , K^{+}_{10} , K^{-} , РРО, РРК, РИ, стоп-реагент, – готовы к использованию.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Проведение ИФА

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Качественное исследование (определение наличия антиHBsAg)

1.1. Извлечь из пакета рамку планшета с необходимым числом стрипов. Неиспользованные стрипы допускается хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

1.2. При использовании одного стрипа внести в 1 лунку 100 мкл K^{+}_{200} , в 1 лунку – 100 мкл K^{+}_{10} и в 2 лунки – по 100 мкл K^{-} ; при использовании 2 и более стрипов внести – в 1 лунку 100 мкл K^{+}_{200} , в 2 лунки – по 100 мкл K^{+}_{10} и в 2 лунки – по 100 мкл K^{-} . В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых образцов.

1.3. Планшет закрыть крышкой и инкубировать в течение 1 ч в термостате при температуре 42 °С во влажной камере или на шейкере в течение 30 мин при температуре 42 °С и скорости вращения платформы 700 об/мин.

1.4. С помощью промывателя удалить образцы из лунок, 1 раз промыть стрипы рабочим промывочным раствором, внося в лунки 350-370 мкл раствора и выдерживая в процессе одного промывания не менее 30 с. По окончании промывки удалить влагу из лунок, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

1.5. Во все лунки внести по 100 мкл рабочего разведения конъюгата, планшет закрыть крышкой и инкубировать 1 ч в термостате при температуре 42 °С во влажной камере или на шейкере в течение 30 мин при температуре 42 °С и скорости вращения платформы 700 об/мин.

1.6. С помощью промывателя удалить жидкость из лунок, 5 раз промыть стрипы, как указано в п. 1.4.

1.7. Во все лунки внести по 100 мкл РИ, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и выдержать 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

1.8. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился РИ) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и не более чем через 5 мин приступить к учету результатов.

Регистрация и учет результатов качественного исследования

Перед учетом результатов дно планшета протереть сначала влажной марлей, а затем – насухо. Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм (допустимо использование фильтра сравнения с длиной волны 620 или 630 нм"; нулевой" уровень ("бланк") спектрофотометра вывести по воздуху.

Результаты ИФА учитывают при соблюдении следующих условий:

значение ОП в лунках с K^{+}_{200} не менее 1,2;

среднее значение ОП в лунках с K^{-} не более 0,15.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Рассчитать $ОП_{крит}$ по формуле

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

где ОП (K^{-})_{ср} – среднее значение ОП в лунках с K^{-} ;

0,05 – коэффициент, полученный экспериментальным путем.

Результат анализа считают **положительным**, если ОП в лунке с исследуемым образцом больше $ОП_{крит}$.

Результат анализа считают **отрицательным**, если ОП в лунке с исследуемым образцом меньше или равно $ОП_{крит}$.

2. Количественное исследование (определение содержания антиHBsAg в мМЕ/мл)

Проводится только с образцами, в которых выявлено наличие антиHBsAg.

2.1. Извлечь из пакета рамку планшета с необходимым числом стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем (силикагелем) при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

2.2. Внести по 100 мкл всех контрольных образцов (K^{+}_{200} , K^{+}_{100} , K^{+}_{50} , K^{+}_{10} , K^{-}), используя по 2 лунки на каждый образец. В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых образцов.

2.3. Провести ИФА, как описано в п.п. 1.3-1.8.

Регистрация и учет результатов количественного исследования

Результаты ИФА учитывают при соблюдении следующих условий:

среднее значение ОП в лунках с K^{+}_{200} не менее 1,2;

среднее значение ОП в лунках с K^{+}_{100} меньше среднего значения ОП в лунках с K^{+}_{200} и больше среднего значения ОП в лунках с K^{+}_{50} ;

среднее значение ОП в лунках с K^{+}_{50} меньше среднего значения ОП в лунках с K^{+}_{100} и больше среднего значения ОП в лунках с K^{+}_{10} ;

среднее значение ОП в лунках с K^{+}_{10} меньше среднего значения ОП в лунках с K^{+}_{50} и больше $ОП_{крит}$, которое рассчитывают по формуле

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

где ОП (K^{-})_{ср} – среднее значение ОП в лунках с K^{-} ;

0,05 – коэффициент, полученный экспериментальным путем;

среднее значение ОП в лунках с K^{-} не более 0,15.

В противном случае исследование необходимо повторить.

В линейных координатах построить калибровочный график, для чего по точкам, ординатами которых являются средние значения ОП в лунках с K^{+}_{200} , K^{+}_{100} , K^{+}_{50} и K^{+}_{10} , а абсциссами – соответствующие значения содержания антиHBsAg в мМЕ/мл (200, 100, 50 и 10), провести кривую.

На калибровочном графике найти точки, ординатами которых являются ОП соответствующих исследуемых образцов; абсциссы этих точек будут искомыми значениями содержания антиHBsAg (в мМЕ/мл) в указанных образцах.

Если содержание анти-HBsAg в образце больше 200 мМЕ/мл, анализ следует повторить, разведя образец в 20 раз (в лунку внести 95 мкл РРО и 5 мкл исследуемого образца). Полученную при этом концентрацию анти-HBsAg умножить на 20. Если концентрация анти-HBsAg разведенного в 20 раз образца вновь превышает 200 мМЕ/мл, его следует развести в 400 раз и повторить анализ.

Для расчета концентрации анти-HBsAg в разведенном образце можно использовать формулу¹

$$C_{\text{анти-HBsAg}} = \frac{ОП_{\text{срX}} - ОП_{\text{срK}}}{ОП_{\text{срK50}} + ОП_{\text{срK}}} \times 50n, \text{ где}$$

$C_{\text{анти-HBsAg}}$ – концентрация анти-HBsAg в разведенном образце;

$ОП_{\text{срX}}$ – среднее значение оптической плотности исследуемого образца;

$ОП_{\text{срK}}$ – среднее значение оптической плотности контрольного отрицательного образца;

$ОП_{\text{срK50}}$ – среднее значение оптической плотности контрольного положительного образца с концентрацией 50 мМЕ/мл

n – кратность разведения

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

ФОРМА ВЫПУСКА

Выпускается в наборе:

Иммуносорбент

K_{200}^{+}

K_{100}^{+}

K_{50}^{+}

K_{10}^{+}

K^{-}

Конъюгат (концентрат x11)

РРО

РРК

ФСБ-Т(x25)

РИ

Стоп-реагент

1 шт.

1 флакон (1,3 мл)

1 флакон (1,3 мл)

1 флакон (1,3 мл)

1 флакон (1,3 мл)

1 флакон (2,5 мл)

1 флакон (1,2 мл)

1 флакон (12,0 мл)

1 флакон (12,0 мл)

1 флакон (40,0 мл)

1 флакон (12,0 мл)

1 флакон (12,5 мл)

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

В упаковке предприятия-изготовителя в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

¹ Моисеева М.А. Роль индикации отдельных специфических маркеров вируса гепатита В в обеспечении вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов: Дисс....канд. биол. наук: 14.00.36, 03.00.06.- М., 2006

Транспортирование

В соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для лечебно-профилактических и санитарно-эпидемиологических учреждений.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК и в учреждение, уполномоченное Росздравнадзором на проведение государственного контроля качества указанной продукции.

Директор по науке ЗАО «ЭКОлаб»

"СОГЛАСОВАНО"

Главный врач КДЛ «Дорожная клиническая больница им. Н.А. Семашко» ОАО «РЖД»

«04»08 2011г

подпись, печать



Р.А. Печенкина



Транспортирование

В соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

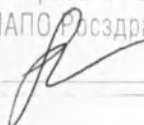
Для лечебно-профилактических и санитарно-эпидемиологических учреждений.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта (49643) 3-37-30 – ОБТК и в учреждение, уполномоченное Росздравнадзором на проведение государственного контроля качества указанной продукции.

Начальник отдела перспективных разработок  Е.А. Амелина

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики РМАПО
В.В. Долгов

Подпись 
удостоверяю: специалист
кадровой работы ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
подпись 



КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТЕРМОСТАТА



качественный анализ

по 100 мкл K^{+}_{200} , K^{+}_{10} , K^{-}

по 100 мкл цельных анализируемых образцов

количественный анализ

по 100 мкл K^{+}_{200} , K^{+}_{100} , K^{+}_{50} , K^{+}_{10} , K^{-} в дублях

по 100 мкл цельных анализируемых образцов в дублях



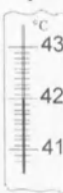
1 час, 42 °C, влажная камера



отмыть 1 раз промывочным раствором



100 мкл рабочего раствора конъюгата



1 час, 42 °C, влажная камера



отмыть 5 раз промывочным раствором



100 мкл раствора индикаторного



30 мин, 18-25 °C, темнота



100 мкл стоп-реагента

Спектрофотометр 450нм (450/620-650 нм)

КРАТКАЯ СХЕМА ИФА
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТЕРМОСТАТИРУЕМОГО ШЕЙКЕРА



качественный анализ

по 100 мкл K^{+}_{200} , K^{+}_{10} , K^{-}

по 100 мкл цельных анализируемых образцов

количественный анализ

по 100 мкл K^{+}_{200} , K^{+}_{100} , K^{+}_{50} , K^{+}_{10} , K^{-} в дублях

по 100 мкл цельных анализируемых образцов в дублях



30 мин, 42 °C, 700 об/мин



отмыть 1 раз промывочным раствором



100 мкл рабочего раствора конъюгата



30 мин, 42 °C, 700 об/мин



отмыть 5 раз промывочным раствором



100 мкл раствора индикаторного



30 мин, 18-25°C, темнота



100 мкл стоп-реагента

Спектрофотометр 450нм (450/620-650 нм)

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

лист 4

Начальник ОНД ЗАО "ЭКОлаб"

Симонов В.В.

"17

20 2017