

«УТВЕРЖДЕНА»

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора
от «__» ____ 20__ г. № ____



Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Швырев М.В.
«22» ноября 2010г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ГепатитИФА-HBsAg»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ГепатитИФА-HBsAg» предназначен для качественного и количественного определения поверхностного антигена (HBsAg) вируса гепатита В (HBV) в сыворотке и плазме крови человека.

1.2. Поверхностный антиген (HBsAg) представляет собой гликозилированный белок оболочки HBV и является важным маркером инфицирования. HBsAg содержит детерминанту «а», общую для всех субтипов вируса и дополнительные субдетерминанты (d и у), определяющие иммунологические различия подгрупп (ad и ау). В настоящее время это основной маркер при определении инфицирования вирусом гепатита В. HBV вызывает острый и хронический вирусный гепатит и чаще других вирусных гепатитов передается при переливании крови. Он вызывает целый спектр проявлений, варьирующих от мягкой, бессимптомной формы до молниеносного гепатита, серьезных поражений печени и цирроза. Кроме того, ясно доказана роль HBV в развитии первичного рака печени.

Количественное определение HBsAg в крови представляется целесообразным при корректировке диагноза и подборе лечения. При проведении скрининга на гепатит В достаточно качественного определения HBsAg в крови.

1.3. Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

Комплектация на 96 определений рассчитана на количественный анализ в дубликатах 40 неизвестных, либо качественный анализ в дубликатах 44 неизвестных проб, при использовании всех стрипов одновременно.

Комплектация на 192 определения рассчитана на количественный анализ в дубликатах 80 неизвестных, либо качественный анализ в дубликатах 88 неизвестных проб, при использовании всех стрипов одновременно.

Обратите внимание, что при количественном анализе определение оптических плотностей калибровочных проб и раствора ТМБ, а также определение концентрации контрольной сыворотки обязательно на каждом планшете.

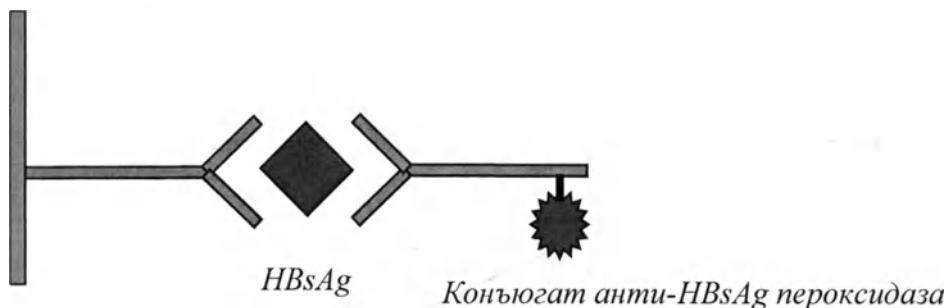
Обратите внимание, что при качественном анализе определение оптических плотностей калибровочной пробы №1 (отрицательный контроль), калибровочной пробы №2 (слабоположительный контроль), калибровочной пробы №6 (положительный контроль) и раствора ТМБ, обязательно на каждом планшете.

Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ГепатитИФА-HBsAg» реализован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к HBsAg. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация HBsAg, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации HBsAg. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству HBsAg в исследуемом образце (Рисунок 1).



Планшет с моноклональными антителами к HBsAg

Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация HBsAg в исследуемых образцах. Наличие HBsAg в случае проведения качественного анализа оценивается относительно значения, полученного делением оптической плотности КП №2 на 2 (ОП крит.).

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к HBsAg» – 1 упаковка или 2 упаковки, в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

97
1

- калибровочные пробы (КП), аттестованные по международному стандарту на HBsAg NIBSC 00/588, содержащие известные количества HBsAg. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентрации HBsAg указаны на этикетках флаконов, ориентировочные: 0; 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0 МЕ/мл; 6 флаконов (по 1 мл) (лиофилизированные препараты или жидкости) (см. таблицу 1);

- конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» - 1 флакон (8 мл) или 1 флакон (16 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» - 1 флакон (6 мл) или 1 флакон (12 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки и плазмы крови, маркирован «Буфер Д» - 1 флакон (50 мл) или 2 флакона (50 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» - 1 флакон (14 мл) или 2 флакона (14 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» - 1 флакон (14 мл) или 2 флакона (14 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» - 1 флакон (14 мл) или 2 флакона (14мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- контрольная сыворотка с известным содержанием HBsAg, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 флакон (1 мл) (лиофилизированный препарат или жидкость) (см. таблицу 1);

- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена) – 1 шт. или 2 шт. в зависимости от комплектации (см. таблицу 1).

Таблица 1. Варианты комплектации

Название компонента	96 определений	192 определения
Комплект стрипов	1 комплект	2 комплекта
Комплект калибровочных проб	1 комплект - 1 мл	1 комплект - 1 мл
Контрольная сыворотка	1 флакон - 1 мл	1 флакон - 1 мл
Конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза	1 флакон - 8 мл	1 флакон - 16 мл
Аналитический водно-солевой раствор	1 флакон - 6 мл	1 флакон - 12мл
Водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки и плазмы крови	1 флакон - 50 мл	2 флакона – по 50 мл
Концентрированный буферный раствор для промывки лунок	1 флакон - 14 мл	2 флакона - по 14 мл
Раствор ТМБ	1 флакон - 14 мл	2 флакона – по 14 мл
Стоп-реагент	1 флакон - 14 мл	2 флакона - по 14 мл
Прозрачный пластиковый пакет с замком	1 шт.	2 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность набора определялась на 200 отрицательных сыворотках крови человека, и составила 99,5%.

3.2. Диагностическая чувствительность определялась на 100 положительных сыворотках крови человека, и составила 100%.

3.3. Коэффициент вариации результатов определения HBsAg в одном и том же образце с использованием набора «ГепатитИФА-HBsAg» не превышает 8%.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации HBsAg в анализируемых образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №3 - №6 и составляет 90-110%.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» HBsAg – проверка соответствия значения определяемой концентрации HBsAg расчётной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и КИП№3. Процент открытия составляет 90–110%.

3.6. Аналитическая чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация HBsAg по ОСО42-28-311-00 в анализируемом образце не превышает 0,05 МЕ/мл.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;

- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C;

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;

- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50–1000 мл;

- стакан стеклянный подходящего объема;

- вода дистиллированная;

- бумага фильтровальная;

- перчатки резиновые или пластиковые;

- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;

- контейнер для дезинфекции;

- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в пробирку, содержащую антикоагулянт. После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или мутную сыворотку и плазму, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 2 суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре -20°C или ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 1 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат Е готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 0,66 мл.

7.1.4. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз. Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.5. Буфер А готов к использованию. Расход Буфера А на один стрип составляет 0,5 мл.

7.1.6. Буфер Д готов к использованию.

7.1.7. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.8. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.9. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

В Приложениях 1 и 2 приведены схемы проведения количественного и качественного анализов, соответственно.

7.1.10. Разведение исследуемых образцов крови. Если концентрация HBsAg в исследуемых образцах по предварительным данным выше 5 МЕ/мл, образцы следует развести буфером Д в 100 и 1000 раз. Пример подготовки образца к анализу:

Образец № 1 (разведение в 100 раз):

990 мкл буфера Д + 10 мкл исследуемого образца.

Образец № 2 (разведение в 1000 раз):

270 мкл буфера Д + 30 мкл образца № 1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

7.2.1.1. Количественный анализ:

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2;

D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 – № 5 - для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 – № 6 - для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 – № 7 - для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 – № 8 - для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.1.2. Качественный анализ:

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1 (отрицательный контроль);

C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2 (слабоположительный контроль);

D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №6 (положительный контроль).

7.2.2. Внести во все лунки, кроме лунок A1 и A2, по 25 мкл аналитического буфера.

7.2.3. Внести в соответствующие лунки по 100 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 100 мкл исследуемых образцов в дубликатах.

Примечание: общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 600–800 об/мин.

7.2.5. Не удаляя содержимого лунок, во все лунки, кроме A1 и A2, немедленно внести по 50 мкл конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза.

7.2.6. Инкубировать в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 600–800 об/мин.

7.2.7. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.4., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5-10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.8. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

7.2.9. Инкубировать стрипы в течение 10 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 600–800 об/мин.

7.2.10. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1-2 минут.

7.2.11. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.10., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение не более 20 минут при температуре $+18...25^{\circ}\text{C}$.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед.ОП.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Количественный анализ

9.1.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации HBsAg в калибровочных пробах (МЕ/мл) (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать программное обеспечение «ИФА Мастер».

Примечание 2: для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B - B_T$$

где B – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,

B_T — среднее арифметическое значение оптической плотности лунок $A1$ и $A2$.

Определить содержание HBsAg в пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию HBsAg умножить на фактор разведения.

9.1.2. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации HBsAg, превышающих номинал КП №6, не допускается. При наличии таких случаев принимать значение концентрации исследуемого образца «выше концентрации КП №6». Для точного определения концентрации необходимо выполнить разведение образцов в соответствии с п. 7.1.10.

9.1.3. Образцы с концентрацией ниже 0,05 МЕ/мл признают отрицательными (не содержащими HBsAg).

Образцы с концентрацией выше или равной 0,05 МЕ/мл должны быть проанализированы в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» для элиминации ложноположительных результатов.

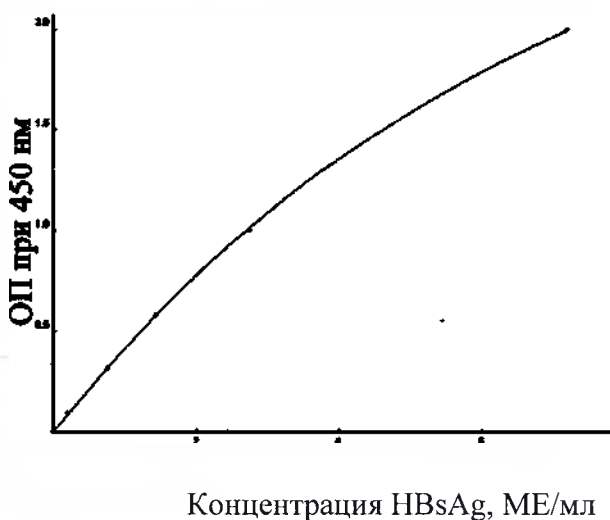


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

9.2. Качественный анализ

Для вычисления ОП_{крит.} оптическую плотность КП №2 разделить на 2.

Образцы с оптической плотностью (ОП) ниже ОП_{крит.} признают отрицательными (не содержащими HBsAg).

Образцы с ОП равной или выше ОП_{крит.} должны быть проанализированы в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» для элиминации ложноположительных результатов.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ГепатитИФА-HBsAg» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора – 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- буфер Д, конъюгат Е, буфер А и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4°эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого количественного анализа необходимо построение калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации HBsAg в контрольной сыворотке;
- для каждого независимого качественного анализа необходимо определение ОП КП№1, КП№2, КП№6 и расчёт ОП крит.;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, буфера А, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ГепатитИФА-НВsAg» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70, телефон/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания АлкорБио»

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to A.S. Sushorova.

Сусорова А.С.

СОГЛАСОВАНО:

Заместитель директора
ФГУ «ФЦСКЭ им.В.А.Алмазова»
Минздравсоцразвития России
по научно-исследовательской работе,
профессор



Конради А.О.