

УТВЕРЖДЕНА

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора
№ _____ от _____ 201__ г.

Генеральный директор
ФГУП «НПО «Микроген»
Минздрава России
В.Ф. Руденко
«07» 03 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

МикрАТ-НВs

Тест-система иммуноферментная для определения антител
к поверхностному антигену вируса гепатита В

Набор реагентов МикрАТ-НВs Тест-система иммуноферментная для определения антител к поверхностному антигену вируса гепатита В выпускается в двух комплектациях (набор № 1 и набор № 2) и включает следующие реагенты для проведения прямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА):

Таблица 1

Реагенты	Описание
1	2
Иммуносорбент	Очищенный HBsAg сорбированный в лунках 96-луночного разборного планшета для ИФА из прозрачного бесцветного полистирола.
Конъюгат (x11 концентрат) - HBsAg, меченный пероксидазой хрена	Прозрачная жидкость синего или синезелёного цвета
K ⁻ - контрольный отрицательный образец донорской плазмы, не содержащей анти-HBs, HBsAg, антител к вирусу гепатита С и ВИЧ-1,2	Прозрачная или опалесцирующая жидкость жёлтого цвета
K ⁺ ₁₀ - контрольный положительный образец, содержащий (10±2) МЕ/л анти-HBs	Прозрачные жидкости от розового до красного цвета
K ⁺ ₅₀ - контрольный положительный образец, содержащий (50±10) МЕ/л анти-HBs	
K ⁺ ₁₀₀ - контрольный положительный образец, содержащий (100±20) МЕ/л анти-HBs	
K ⁺ ₂₀₀ - контрольный положительный образец, содержащий (200±40) МЕ/л анти-HBs	
ФСР-Т (x25 концентрат) - фосфатно-солевой буферный раствор с твином-80	Прозрачная или опалесцирующая жидкость бесцветная или жёлтого цвета; допускается выпадение кристаллического осадка.

1	2
ЦБ – цитратный буферный раствор, содержащий водорода перекись	Прозрачные, бесцветные жидкости
ТМБ (х5 концентрат) - раствор 3,3',5,5'- тетраметилбензида в димексиде	
Стоп-реагент – 1М раствор кислоты серной	

Наборы № 1 и № 2 рассчитаны на проведение 96 анализов, включая контрольные.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «МикрАТ-НВs» предназначен для выявления и количественной оценки содержания антител (анти-НВs) к поверхностному антигену вируса гепатита В (НВsAg) в сыворотке/плазме, препаратах крови (иммуноглобулинах и др.).

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Меры предосторожности.

Входящие в набор реагентов контрольные образцы инактивированы. Однако, исследуемая сыворотка и плазма крови людей, а также сточные растворы, оборудование и материалы, находящиеся с ними в контакте представляют собой потенциально инфекционный материал, и обращаться с ним следует осторожно: при работе использовать резиновые перчатки; оборудование, находившееся в контакте с биологическими образцами и реагентами, дезинфицировать до и после работы спирта этилового раствором 70 %; все использованные материалы обеззараживать водорода перекиси раствором 6 % или хлорамина Б раствором 3 % в течение 2 ч, или автоклавированием при $(2,0 \pm 0,1)$ кгс/см² ($(0,20 \pm 0,01)$ МПа), (132 ± 2) °С в течение 60 мин; при работе с растворами ТМБ и кислоты серной не использовать пипетки с металлическими частями и избегать попадания этих растворов на кожный покров. Загрязнённые участки кожи и слизистые оболочки обильно промывать водой.

Дополнительные материалы и оборудование

Материалы: ванночки для реагентов; вата гигроскопичная; вода дистиллированная или деионизированная; крышки или липкая плёнка для закрывания планшетов; мерный стакан или цилиндр вместимостью 1000 мл; наконечники полипропиленовые вместимостью 0,5-300 мкл, 100-1000 мкл, 1-5 мл, 2-10 мл; перчатки рези-

новые; растворы для обеззараживания: хлорамина Б раствор 3%, водорода перекиси раствор 6 %, спирта этилового раствор 70 %; флаконы стеклянные или пластиковые вместимостью 10, 20 мл с резиновыми или пластиковыми пробками.

Оборудование: анализатор иммуноферментный с тест-фильтром 450 нм и референс-фильтром 620 нм; дозаторы пипеточные для внесения жидкостей: 1-канальные с переменным объёмом от 5 до 50 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл, от 1 до 5 мл, от 2 до 10 мл и 8-канальные с переменным объёмом от 50 до 300 мкл; контейнеры для обеззараживания твердых и жидких отходов; промыватель планшетов автоматический; термостат с диапазоном рабочих температур от 28 до 55 °С.

Требования к образцам

Исследуемые образцы хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст, при температуре от 2 до 8 °С. Если образцы сыворотки или плазмы не могут быть исследованы в течение 3 сут, их следует заморозить и хранить при температуре не выше минус 18 °С не более 1 года. Замороженные образцы перед исследованием разморозить при комнатной температуре. Перед использованием образцы тщательно перемешать путем встряхивания. Повторное замораживание не допускается. Исследование образцов с выраженным гемолизом, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, не допускается, так как могут быть получены ложноположительные или ложноотрицательные результаты ИФА.

Лиофилизированные препараты крови перед исследованием растворить в дистиллированной воде (если иное не указано в ФСП на препарат) и довести объем до номинального.

Приготовленные растворы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут.

Подготовка реагентов для ИФА

Все компоненты перед использованием выдержать не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С. В случае выпадения кристаллов солей в ФСР-Т (х25 концентрат), прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка. Растворы готовить в зависимости от количества используемых стрипов иммуносорбента в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Приготовление рабочих растворов концентрированных реагентов

Кол-во стрипов	Рабочий раствор ФСР-Т		Рабочий раствор конъюгата		Субстратный раствор	
	ФСР-Т x25 концентрат, мл	Вода дистиллированная, мл	Конъюгат x11 концентрат, мл	Рабочий раствор ФСР-Т, мл	ТМБ x5 концентрат, мл	ЦБ, мл
1	2,5	60,0	0,05	0,5	0,25	1,0
2	5,0	120,0	0,10	1,0	0,50	2,0
3	7,5	180,0	0,15	1,5	0,75	3,0
4	10,0	240,0	0,20	2,0	1,00	4,0
5	12,5	300,0	0,25	2,5	1,25	5,0
6	15,0	360,0	0,30	3,0	1,50	6,0
7	17,5	420,0	0,35	3,5	1,75	7,0
8	20,0	480,0	0,40	4,0	2,00	8,0
9	22,5	540,0	0,45	4,5	2,25	9,0
10	25,0	600,0	0,50	5,0	2,50	10,0
11	27,5	660,0	0,55	5,5	2,75	11,0
12	30,0	720,0	0,60	6,0	3,00	12,0

Рабочий раствор ФСР-Т хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут. Рабочий раствор конъюгата и субстратный раствор хранению не подлежат.

После отбора необходимого количества оставшиеся концентраты реагентов и неиспользованные стрипы хранить плотно закрытыми в пакете в течение срока годности при температуре от 2 до 8 °С.

Проведение ИФА

Иммуносорбент перед использованием промыть 2 раза рабочим раствором ФСР-Т, заполняя лунки до краёв и удаляя промывающий раствор в ёмкость с дезинфицирующим раствором. Промытый иммуносорбент хранению не подлежит!

При использовании 1 стрипа иммуносорбента внести по 150 мкл: контрольные образцы - каждый в 1 лунку, исследуемые образцы – в оставшиеся лунки. При использовании большего количества стрипов контрольные образцы внести не менее чем в 2 лунки каждый.

В каждую лунку добавить по 50 мкл рабочего раствора конъюгата, не касаясь наконечником пипетки образцов в лунках. Содержимое лунок перемешать осторожным постукиванием по краям планшета в течение 20-30 с.

Планшет закрыть липкой лентой или крышкой и инкубировать в течение 2 ч при температуре 45 °С или 2,5 ч при температуре 37 °С, затем промыть 6 раз рабочим раствором ФСР-Т как описано выше.

В каждую лунку внести по 150 мкл субстратного раствора. Планшет выдержать

в течение (25 ± 5) мин при температуре от 18 до 25 °C в защищённом от света месте.

Ферментативную реакцию остановить добавлением в лунки по 50 мкл стоп-реагента.

Учёт и интерпретация результатов

Не позднее 5 мин после остановки реакции стоп-реагентом измерить оптическую плотность (ОП) в оптических единицах (о.е.) на анализаторе иммуноферментном при двух длинах волн (при использовании основного фильтра – 450 нм и референс-фильтра – 620 нм).

Рассчитать средние значения ОП для K^- ($ОП_{ср. K^-}$), контрольных положительных образцов, разведений СОП.

Вычислить значение критической ОП ($ОП_{крит.}$) по формуле:

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср. K^-} + 0,050$$

Рассчитать содержание анти-HBs в исследуемых образцах, если между ОП контрольных положительных образцов и $ОП_{крит.}$ соблюдаются следующие соотношения: средние значения $ОП_{ср. K^+ 10}$ больше или равно $ОП_{крит.}$; $ОП_{ср. K^+ 50}$ более чем в 2 раза превышает $ОП_{крит.}$; $ОП_{ср. K^+ 100}$ более чем в 4 раза превышает $ОП_{крит.}$; $ОП_{ср. K^+ 200}$ более чем в 8 раз превышает $ОП_{крит.}$.

Неразведённые исследуемые образцы, значения ОП которых ниже значения $ОП_{крит.}$, оценивать как отрицательные. Образцы, значения ОП которых равны или превышают значение $ОП_{крит.}$, оценивать как положительные.

Если ОП неразведённого исследуемого положительного образца выше 1,200, необходимо эмпирически подобрать его разведение, приготовленное на рабочем растворе ФСР-Т, ОП которого попадет в диапазон от 0,200 до 1,200.

Содержание анти-HBs в положительном исследуемом образце вычислять следующим образом:

Набор № 1

По формуле:

$$CX = \frac{ОП X - ОП_{ср. K^-}}{ОП_{ср. K^+ 50} - ОП_{ср. K^-}} \times 50 \text{ н},$$

где CX – содержание анти-HBs в исследуемом образце;

ОП X – среднее значение оптической плотности исследуемого образца;

$ОП_{ср. K^-}$ – среднее значение оптической плотности контрольного отрицательного

образца;

$ОП_{ср. K^+_{50}}$ - среднее значение оптической плотности K^+_{50} ;

50 – содержание анти-HBs в K^+_{50} (МЕ/л);

n – кратность разведения исследуемого образца.

Набор № 2

По калибровочной кривой, построенной с использованием контрольных положительных образцов. Калибровочный график построить на масштабной координатной бумаге или с помощью компьютера в программе Microsoft Excel: на оси абсцисс «х» отметить величины концентраций в K^+_{10} , K^+_{50} , K^+_{100} , K^+_{200} (10; 50; 100; 200 МЕ/л), на оси ординат «у» - соответствующие средние значения $ОП_{ср.}(o.e.)$. По полученным точкам провести калибровочную кривую. Для определения содержания анти-HBs в исследуемом образце на оси «у» отметить его ОП. От полученной точки восстановить перпендикуляр до пересечения с калибровочной кривой. Точку пересечения спроецировать на ось «х». Полученный на оси «х» числовой показатель, умноженный на кратность разведения, является искомым значением содержания анти-HBs в исследуемом образце.

В пределах диапазона от 25 до 200 МЕ/л значения ОП пропорциональны концентрации анти-HBs, коэффициент корреляции составляет не менее 0,995.

Предел обнаружения (аналитическая чувствительность) - (8 ± 2) МЕ/л.

Предел количественного определения (минимальная определяемая концентрация) - (24 ± 6) МЕ/л.

ФОРМА ВЫПУСКА

Набор реагентов выпускается в двух комплектациях.

Набор № 1 включает: ИММУНОСОРБЕНТ - 1 планшет; КОНЬЮГАТ (x11 концентрат) - 1 фл./проб., 0,6 мл; K^- - 1 фл./проб., 1,8 мл; K^+_{50} - 1 фл./проб., 1,8 мл; ФСР-Т (x 25 концентрат) - 1 фл., 30 мл; ЦБ - 1 фл., 12 мл; ТМБ (x5 концентрат) - 1 фл., 3 мл; СТОП-РЕАГЕНТ - 1 фл., 6 мл; упакованных в картонную коробку, в которую вложена инструкция по применению.

Набор № 2 дополнительно включает K^+_{10} - 1 фл./проб., 1,8 мл; K^+_{100} - 1 фл./проб., 1,8 мл; K^+_{200} - 1 фл./проб., 1,8 мл..

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности 6 месяцев.

По истечении срока годности набор реагентов применению не подлежит.

Хранение в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 в течение всего срока годности при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 2 недель. Замораживание не допускается.

Рекламации на качество набора реагентов направлять в адрес предприятия – производителя ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России по адресу: 115088, г. Москва, ул. 1-ая Дубровская, д. 15, тел. (495) 710-37-87.

Адрес производства: Россия, 603950, Нижегородская область, г. Нижний Новгород, ул. Грузинская, д. 44, тел. (831) 434-42-77.