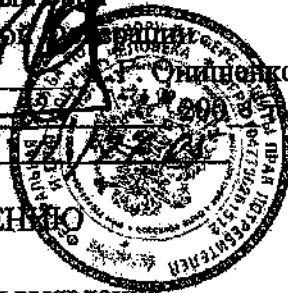


УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации

« 29 » _____ 2009
№ 01



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ «ИФА-HBsAg»

Тест-системы иммуноферментной для выявления
поверхностного антигена вируса гепатита В
Комплекты № 1, № 2

Тест-система представляет собой наборы диагностические многокомпонентные, включающие следующие реагенты для проведения прямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА):

- **ИММУНОСОРБЕНТ** – моноклональные антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg), сорбированные на планшете для ИФА. Планшеты цельные или разборные из прозрачного бесцветного полистирола;
- **КОНЬЮГАТ** (10-кратный концентрат) - моноклональные анти-HBs, меченные пероксидазой хрена, прозрачная жидкость сине-зелёного цвета;
- **РАЗБАВИТЕЛЬ КОНЬЮГАТА** - раствор для разведения концентрата конъюгата, прозрачная жидкость желтоватого цвета или бесцветная;
- **K⁺** - положительный контрольный образец - раствор содержащий HBsAg выделенный из плазмы донорской крови в конечной концентрации (40 ± 4) нг/мл, инактивированный прогреванием, прозрачная жидкость красного цвета;
- **K⁺_{оп.}** - слабоположительный контрольный образец - плазма крови доноров, содержащая HBsAg в конечной концентрации 0,50 нг/мл, инактивированная прогреванием, гигроскопичная пористая масса белого или желтого цвета;
- **K⁻** - отрицательный контрольный образец - плазма крови доноров, не содержащая антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и к вирусу гепатита С, инактивированная прогреванием нормальная, прозрачная или опалесцирующая жидкость желтого цвета;
- **СУБСТРАТНЫЙ РАСТВОР** (готовый для использования), прозрачная жидкость голубоватого цвета или бесцветная, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ) или
- **ЦБ** - цитратный буферный раствор, содержащий водорода перекись, прозрачная

Взамен инструкции, утвержденной 19.11.2002г.

бесцветная жидкость, в комплекте с 5-кратным концентратом раствора ТМБ, прозрачная бесцветная жидкость или с таблетками ортофенилендиамина (ОФД) белого цвета;

- СТОП-РЕАГЕНТ - 5 % раствор кислоты серной, прозрачная бесцветная жидкость;
- ФСР-Т (25-кратный концентрат) - фосфатно-солевой раствор с твином-80, прозрачная жидкость желтого цвета или бесцветная, допускается выпадение кристаллического осадка солей белого цвета растворяющихся при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30-40 мин.

Комплект №2 дополнительно включает:

- НС - нормальная козья сыворотка, прозрачная жидкость сине-зелёного цвета;
- ИС - иммунная козья сыворотка, содержащая анти-НВs, прозрачная жидкость красного цвета.

Тест-система позволяет выявлять НВsAg при помощи ИФА в концентрации 0,125 нг/мл при комплектации ТМБ и 0,25 нг/мл при комплектации ОФД, а также подтверждать специфичность положительных результатов ИФА на НВsAg (подтверждающий тест).

Комплект № 1 рассчитан на проведение 192 скрининговых анализов, комплект № 2 - 192 скрининговых или 96 подтверждающих тестов, включая контрольные.

Назначение.

Комплект № 1 – выявление поверхностного антигена вируса гепатита "В" (НВsAg) в сыворотке (плазме) крови, иммуноглобулинах, интерфероне и других препаратах крови методом иммуноферментного анализа (ИФА). Комплект № 2 – выявление НВsAg в сыворотке (плазме) крови, иммуноглобулинах, интерфероне и других препаратах крови методом ИФА и подтверждение специфичности положительных результатов ИФА на НВsAg.

Способ применения и учёт результатов.

Подготовка реагентов для ИФА

1. РЕГИДРАТАЦИЯ ИММУНОСОРБЕНТА. Перед использованием иммуносорбента лунки планшета (стрипов) заполняют до краёв раствором ФСР-Т и выдерживают в течение 3-5 мин, затем раствор удаляют. Регидратированный иммуносорбент хранению не подлежит.

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА ФСР-Т. Содержимое флакона с 25-кратным концентратом ФСР-Т (20 мл) разводят в 480 мл воды дистиллированной. Приготовлен-

ный раствор используют для промывания планшетов. Хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут.

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА $K^+_{\text{сн}}$. Содержимое ампулы растворяют добавлением воды дистиллированной в объёме, указанном на этикетке. Приготовленный раствор хранению не подлежит.

4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА КОНЬЮГАТА. К 9 мл разбавителя конъюгата добавляют 1 мл 10-кратного концентрата конъюгата и перемешивают. Приготовленный раствор хранению не подлежит.

5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СУБСТРАТНОГО РАСТВОРА. При комплектации тест-системы ОФД таблетку с содержанием основного вещества 10 мг растворяют в 10 мл ЦБ при непрерывном встряхивании в течение 3-4 мин. При работе с неполным разборным планшетом таблетку ОФД с содержанием основного вещества 6 мг растворяют в 3,3 мл ЦБ. При комплектации тест-системы ТМБ 2 мл 5-кратного концентрата разводят добавлением 8 мл ЦБ. Приготовленные растворы хранению не подлежат.

Требования к образцам.

Для предотвращения ложных результатов исследуемые образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 48 часов. Более длительное хранение возможно при температуре не выше минус 15 °С без многократного замораживания-оттаивания. Не использовать проросшие, хилезные и сильно гемолизные сыворотки.

Проведение ИФА

СКРИНИНГОВЫЙ ТЕСТ

В 4 лунки регидратированного иммуносорбента (планшета/стрипов) вносят по 100,0 мкл K^+ , в 2 лунки - по 100,0 мкл $K^+_{\text{сн}}$, в 2 лунки - по 100,0 мкл K^+ , в остальные лунки вносят исследуемые образцы в таком же объёме. Планшет закрывают крышкой и выдерживают во влажной камере при температуре $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 2 ч или при температуре от 18 до 25 °С в течение 18-22 ч, затем промывают 3-4 раза, наполняя лунки до краёв раствором ФСР-Т и удаляя промывающий раствор в ёмкость, до половины заполненную 6 % раствором монохлорамина.

Раствор конъюгата вносят в лунки по 100,0 мкл, планшет закрывают крышкой, выдерживают при температуре $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 1 ч, затем промывают 5-6 раз раствором ФСР-Т и 1 раз дистиллированной водой.

Субстратный раствор вносят в лунки по 100,0 мкл, планшеты выдерживают в течение 15-20 мин при температуре от 18 до 25 °С, затем добавляют по 50,0 мкл стоп-реагента и немедленно учитывают результаты ИФА.

Проводят измерение оптической плотности (ОП) субстратного раствора в лунках планшета с помощью анализатора иммуноферментного АИФ-М340 (ПО "Витязь", г. Витебск) или аналогичного, установив "0" прибора по воздуху. Для субстратного раствора, содержащего ТМБ, выбирают светофильтр 450 нм, для раствора ОФД - 492 нм.

Результаты ИФА оценивают, если среднее значение ОП субстратного раствора в лунках с К⁻ (ОП_{ср.К⁻}) не превышает 0,150, в лунках с К⁺ составляет не менее 1,000, а в лунках с К⁺_{сд.} превышает критическое значение. В случае, если ОП_{ср.К⁻} выше 0,150, производят следующую корректировку: одно индивидуальное значение К⁻ с самой высокой ОП исключают и ОП_{ср.К⁻} вычисляют повторно.

Критическое значение (ОП_{крит.}) рассчитывают по формуле 1:

$$\text{ОП}_{\text{крит.}} = \text{ОП}_{\text{ср.К}^-} + 0,060,$$

где 0,060 - постоянный коэффициент, установленный предприятием-изготовителем.

Исследуемые образцы, ОП которых превышает ОП_{крит.}, обязательно исследуют повторно в подтверждающем тесте с использованием комплекта № 2.

Высокочувствительные методы ИФА во избежание ложно-положительных результатов требуют особой тщательности при промывке иммуносорбента в ходе анализа.

ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ ТЕСТ

Образцы исследуемой сыворотки, К⁻ и К⁺ вносят по 100,0 мкл в 2 лунки каждый, затем в одну лунку добавляют по 10,0 мкл НС, в другую - по 10,0 мкл ИС и перемешивают пипетированием. Далее ИФА проводят, как было описано.

Результаты подтверждающего теста оценивают, если ОП_{пробы} превышает ОП_{крит.}; ОП К⁻ в обеих лунках не превышает 0,150; ОП К⁺ в лунке с добавлением НС превышает 1,000 и нейтрализуется добавлением ИС более чем на 50 %.

Исследуемый образец считают положительным, если его ОП в лунке с добавлением ИС (ОП_{пробы} + ИС) снижается на 50 % и более по сравнению с лункой, где добавлена НС (ОП_{пробы} + НС).

Вычисление проводят по формуле 2:

$$\frac{(\text{ОП}_{\text{пробы}} + \text{НС}) - (\text{ОП}_{\text{пробы}} + \text{ИС})}{(\text{ОП}_{\text{пробы}} + \text{НС}) - (\text{ОП К}^+ + \text{НС})} \times 100 \geq 50 \%$$

В случаях, когда $ОП_{пробы} + НС$ превышает 2, для расчета используют цифру 2. Если величина специфической нейтрализации при этом составит менее 50 %, то пробу необходимо развести в 10, 100 и 1000 раз раствором ФСР-Т и повторить тестирование.

Условия отпуска.

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Форма выпуска.

Тест-система выпускается в виде комплекта ИММУНОСОРБЕНТ - 2 планшета; КОНЬЮГАТ (10-кратный концентрат) - 1 фл., 2,0 мл; РАЗБАВИТЕЛЬ КОНЬЮГАТА - 1 фл., 20,0 мл; K^+ - 1 фл., 2,0 мл; K^- - 1 фл., 2,0 мл; $K^+_{сл.}$ - 2 амп.; ФСР-Т (25-кратный концентрат) - 2 фл. по 20,0 мл; СТОП-РЕАГЕНТ - 1 фл., 10,0 мл; СУБСТРАТНЫЙ РАСТВОР (готовый для использования) - 2 фл. по 10,0 мл или ЦБ - 2 фл. по 10,0 мл в комплекте с ОФД (2 табл. по 10,0 мг или 6 табл. по 6,0 мг) - 1 фл. или с ТМБ (5-кратный концентрат) - 1 фл., 4,0 мл и инструкция по применению.

Комплект № 2 дополнительно включает: НС - 1 фл., 1,0 мл; ИС - 1 фл., 1,0 мл.

Срок годности, условия хранения и транспортирования.

Срок годности - 6 мес. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит. Хранят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С в недоступном для детей месте. Транспортируют в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 25 °С не более 2 недель. Замораживание не допускается.

Рекламации на качество препарата направлять в Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел./факс (095) 241-39-22) и в адрес предприятия-производителя - ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, 115088, г. Москва, ул. 1-я Дубровская, 15, тел. (095) 981-62-00; (Адрес производства: 603000, г. Нижний Новгород, ул. Грузинская, д. 44, тел./факс (8312) 34-42-77).

Первый заместитель
Генерального директора
ФГУП НПО «Микроген»

А.В.Семченко

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

5 листа(ов)

КОПИЯ ВЕРНА

Национального управления
регистрации и обеспечения
качества лекарственных средств

С.А. Коровкин