

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

_____ М.Д. Хусаинов

«06» _____ 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного подтверждения
присутствия HBs-антигена вируса гепатита В
«HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ (далее по тексту – набор) предназначен для подтверждения присутствия HBs-антигена вируса гепатита В методом конкурентного иммуноферментного анализа, основанного на принципе нейтрализации HBsAg специфическими антителами. Положительный результат, полученный в постановке любого комплекта набора реагентов HBsAg-ИФА-БЕСТ, должен быть подтвержден в реакции нейтрализации с использованием набора HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ. Минимальная концентрация HBsAg, выявляемая с помощью данного набора, составляет по стандартному образцу предприятия, содержащему HBsAg (рег. № 05-2-433), аттестованному ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», 0,01 МЕ/мл.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 44 неизвестных образца, 4 контрольных образцов, всего 48 определений при использовании всего планшета. Для исследования небольшой партии проб предусмотрено использование 2 стрипов по 8 анализов (4 контрольных образцов и 4 неизвестных образцов).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации при добавлении в лунки планшета исследуемого образца и биотинилиро-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым и зав. лабораторией И.Н. Кувишиновой

ванных поликлональных антител происходит связывание моноклональных антител, иммобилизованных на внутренней поверхности лунок, и биотинилированных поликлональных антител с HBsAg в анализируемом образце. Во время второй инкубации стрептавидин, меченный пероксидазой, связывается с биотинилированными поликлональными антителами к HBsAg, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Во время третьей инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы антиген-антитело. Степень окраски пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых пробах. Если во время первой инкубации в лунки дополнительно добавляется раствор подтверждающего агента, содержащий антитела к HBs-антигену, происходит нейтрализация HBsAg, что в конечном итоге приводит к уменьшению степени окраски (подавлению сигнала) в лунках на последней стадии ИФА. Если % подавления сигнала 50% и более, то исследуемый образец считают положительным. Таким образом, для подтверждения присутствия HBsAg исследуемые образцы анализируют попарно – в прямом ИФА (без добавления подтверждающего агента) и в конкурентном ИФА (с добавлением подтверждающего агента).

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), содержащий рекомбинантный HBsAg, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- слабоположительный контрольный образец ($K^+_{\text{слаб}}$), содержащий рекомбинантный HBsAg в концентрации $(0,04 \pm 0,02)$ МЕ/мл, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-), не содержащий HBsAg, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат № 1, концентрат – биотинилированные поликлональные антитела к HBsAg – 1 флакон (0,8 мл);
- конъюгат № 2, концентрат – конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена – 1 флакон (1,5 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата №1 (РПК №1) – 1 флакон (7,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата №2 (РПК №2) – 1 флакон (13,0 мл);
- раствор подтверждающего агента (РПА) – 1 флакон (3,0 мл);

7

ванных поликлональных антител происходит связывание моноклональных антител, иммобилизованных на внутренней поверхности лунок, и биотинилированных поликлональных антител с HBsAg в анализируемом образце. Во время второй инкубации стрептавидин, меченный пероксидазой, связывается с биотинилированными поликлональными антителами к HBsAg, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Во время третьей инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы антиген-антитело. Степень окраски пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых пробах. Если во время первой инкубации в лунки дополнительно добавляется раствор подтверждающего агента, содержащий антитела к HBs-антигену, происходит нейтрализация HBsAg, что в конечном итоге приводит к уменьшению степени окраски (подавлению сигнала) в лунках на последней стадии ИФА. Если % подавления сигнала 50% и более, то исследуемый образец считают положительным. Таким образом, для подтверждения присутствия HBsAg исследуемые образцы анализируют попарно – в прямом ИФА (без добавления подтверждающего агента) и в конкурентном ИФА (с добавлением подтверждающего агента).

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), содержащий рекомбинантный HBsAg, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- слабоположительный контрольный образец ($K^+_{\text{слаб}}$), содержащий рекомбинантный HBsAg в концентрации $(0,04 \pm 0,02)$ МЕ/мл, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-), не содержащий HBsAg, инактивированный, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат № 1, концентрат – биотинилированные поликлональные антитела к HBsAg – 1 флакон (0,8 мл);
- конъюгат № 2, концентрат – конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена – 1 флакон (1,5 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата №1 (РПК №1) – 1 флакон (7,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата №2 (РПК №2) – 1 флакон (13,0 мл);
- раствор подтверждающего агента (РПА) – 1 флакон (3,0 мл);

- раствор для разведения образцов (РРО) – 1 флакон (21,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагентов – 4 шт.;
- наконечниками для пипеток на 4–200 мкл – 32 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность: минимальная концентрация HBsAg, определяемая по стандартному образцу предприятия, содержащему HBsAg (рег. № 05-2-433), аттестованному ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», составляет 0,01 МЕ/мл.

3.2. Специфичность: по результатам анализа сывороток стандартной панели предприятия, не содержащих HBsAg (рег. № 05-2-104), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», составляет 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

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

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в по-

мещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;
- холодильник бытовой;
- термостатируемый шейкер орбитального типа на 700–800 об/мин, поддерживающий температуру $(42 \pm 1)^\circ C$ либо $(37 \pm 1)^\circ C$;
- автоматический промыватель для планшетов;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей до 350 мкл;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл, 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл, 2000 мл;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки (плазмы) крови. После размораживания образцы тщательно перемешать.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре

мещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;

– холодильник бытовой;

– термостатируемый шейкер орбитального типа на 700–800 об/мин, поддерживающий температуру $(42 \pm 1)^\circ\text{C}$ либо $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

– автоматический промыватель для планшетов;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей до 350 мкл;

– перчатки резиновые хирургические;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл, 1000 мл;

– колба вместимостью 1000 мл, 2000 мл;

– вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки (плазмы) крови. После размораживания образцы тщательно перемешать.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре

от 18 до 25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °С в течение времени не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного, слабоположительного и отрицательного контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

Приготовление рабочего раствора конъюгата № 1.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата № 1 и добавить необходимое количество концентрата конъюгата №1, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата № 2.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата № 2 и добавить необходимое количество концентрата конъюгата № 2, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С.

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество концентрата тетраметилбензидина и добавить необходимое количество субстратного буферного раствора, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

Таблица расхода компонентов набора

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата № 1		Рабочий раствор конъюгата № 2		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Промывочный раствор	
	Конъюгат № 1, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 1, мл	Конъюгат № 2, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 2, мл	Концентрат тетраметилбензидина, мкл	Субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Вода дистиллированная, мл
2	100	1,0	200	2,0	100	2,0	4,0	до 100
4	200	2,0	400	4,0	200	4,0	8,0	до 200
6	300	3,0	600	6,0	300	6,0	12,0	до 300
8	400	4,0	800	8,0	400	8,0	16,0	до 400
10	500	5,0	1000	10,0	500	10,0	20,0	до 500
12	600	6,0	1200	12,0	600	12,0	24,0	до 600

7.9. Внесение контрольных и исследуемых образцов.

7.9.1. Контрольные и анализируемые образцы вносить в дублях в лунки двух стрипов – одна лунка используется для постановки прямого ИФА (с добавлением РРО, не содержащего нейтрализующих HBsAg антител), вторая – для конкурентного ИФА (с добавлением РПА, содержащего нейтрализующие HBsAg антитела). Соответственно, стрипы следует использовать попарно – один для постановки прямого, другой – для конкурентного ИФА.

7.9.2. Во все лунки стрипов для прямого ИФА (например, с нечетными номерами) внести по 50 мкл РРО, а во все лунки стрипов для конкурентного ИФА (например, с четными номерами) – по 50 мкл РПА.

7.9.3. Внести по 100 мкл контрольных образцов в лунки стрипов для прямого и конкурентного ИФА:

- 2 лунки – по 100 мкл K⁺;

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С.

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) в ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество концентрата тетраметилбензидина и добавить необходимое количество субстратного буферного раствора, тщательно перемешать.

Хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

Таблица расхода компонентов набора

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата № 1		Рабочий раствор конъюгата № 2		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Промывочный раствор	
	Конъюгат № 1, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 1, мл	Конъюгат № 2, концентрат, мкл	Раствор для разведения конъюгата № 2, мл	Концентрат тетраметилбензидина, мкл	Субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Вода дистиллированная, мл
2	100	1,0	200	2,0	100	2,0	4,0	до 100
4	200	2,0	400	4,0	200	4,0	8,0	до 200
6	300	3,0	600	6,0	300	6,0	12,0	до 300
8	400	4,0	800	8,0	400	8,0	16,0	до 400
10	500	5,0	1000	10,0	500	10,0	20,0	до 500
12	600	6,0	1200	12,0	600	12,0	24,0	до 600

7.9. Внесение контрольных и исследуемых образцов.

7.9.1. Контрольные и анализируемые образцы вносить в дублях в лунки двух стрипов – одна лунка используется для постановки прямого ИФА (с добавлением РРО, не содержащего нейтрализующих HBsAg антител), вторая – для конкурентного ИФА (с добавлением РПА, содержащего нейтрализующие HBsAg антитела). Соответственно, стрипы следует использовать попарно – один для постановки прямого, другой – для конкурентного ИФА.

7.9.2. Во все лунки стрипов для прямого ИФА (например, с нечетными номерами) внести по 50 мкл РРО, а во все лунки стрипов для конкурентного ИФА (например, с четными номерами) – по 50 мкл РПА.

7.9.3. Внести по 100 мкл контрольных образцов в лунки стрипов для прямого и конкурентного ИФА:

- 2 лунки – по 100 мкл K⁺;