

**ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов**

"ИФА-НВsAg"

**Тест-система иммуноферментная для выявления и
подтверждения содержания НВs-антигена
вируса гепатита В**

Комплект № 1

Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/02609 от 04.05.08

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
"ИФА-НВsАg"

Тест-система иммуноферментная для выявления и подтверждения содержания
НВs-антигена вируса гепатита В¹

Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/02609 от 04.05.08

Комплект № 1

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление содержания НВsАg в сыворотке (плазме) крови человека, а также препаратах, приготовленных из крови человека (лейкоцитарный интерферон, иммуноглобулины и т.п.), методом прямого иммуноферментного анализа (ИФА) в варианте "ручной" постановки или с использованием ИФА-анализатора типа GENEIS RMP.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемых образцах НВsАg он взаимодействует с антителами, иммобилизованными на поверхности лунок иммуносорбента. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело" связывается затем с конъюгатом и выявляется в цветной реакции с хромогеном.

СОСТАВ НАБОРА

Иммуносорбент – моноклональные антитела к НВsАg, сорбированные в лунках разборных полистироловых планшетов с плоским дном для ИФА 2 шт.

К⁺ – контрольный положительный образец - сыворотка крови человека, не содержащая антитела к НВsАg, ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная прогреванием при температуре 56 °С в течение 2 ч, в которую внесен рекомбинантный НВsАg в концентрации не менее 5,0 МЕ/мл; содержит мертиолят в конечной концентрации 0,01 %; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость с желтым оттенком различной интенсивности 1 флакон 2,0 мл.

К⁺_{слаб} – контрольный слабopоложительный образец – сыворотка крови человека, не содержащая антитела к НВsАg, ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная прогреванием при температуре 56 °С в течение 2 ч, в которую внесен рекомбинантный НВsАg в концентрации 0,1 МЕ/мл; прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтым оттенком различной интенсивности или аморфная масса белого цвета с желтым оттенком, после растворения – опалесцирующая жидкость слабо-желтого цвета 2 флакона по 1,0 мл.

К⁻ – контрольный отрицательный образец – сыворотка крови человека, не содержащая НВsАg, антитела к НВsАg, ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная прогреванием при температуре 56 °С в течение 2 ч, содержащая мертиолят в конечной концентрации 0,01 %; прозрачная или со слабой опалесценцией жидкость с желтым оттенком различной интенсивности 1 флакон 2,0 мл.

Конъюгат – моноклональные мышиные антитела к НВsАg, меченные пероксидазой хрена; прозрачная красного цвета жидкость 2 флакона по 3,2 мл.

РРК – раствор для разведения конъюгата - опалесцирующая жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком 2 флакона по 3,2 мл.

¹ Взамен инструкции, утвержденной 19.06.08 г., № 01-11/75-08

ФСБ-Т(x25) – 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином - прозрачная пенящаяся бесцветная жидкость; возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин 1 флакон 80,0 мл.

ЦБР – цитратный буферный раствор, содержащий перекись водорода; прозрачная бесцветная жидкость 2 флакона по 20,0 мл.

ТМБ – хромоген – раствор тетраметилбензидина; прозрачная бесцветная жидкость 1 флакон 2,2 мл.

Стоп-реагент – водный 0,5 моль/л раствор серной кислоты; прозрачная бесцветная жидкость 1 флакон 25,0 мл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набор рассчитан на проведение 192 анализов, включая контрольные образцы. Чувствительность (минимальная концентрация HBsAg, выявляемая в отраслевом стандартном образце HBsAg) - 0,05 МЕ/мл.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако исследуемые образцы следует считать потенциально инфицированными вирусом гепатита В, поэтому обращение с ними требует соблюдения требований безопасности при серологических исследованиях материалов, потенциально инфицированных возбудителями II группы патогенности (СП 1.32322-08. Санитарные правила "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами").

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Достоверность результатов анализа зависит от строгого соблюдения следующих правил:

- Используйте реагенты только данной серии набора.
- Не используйте набор с истекшим сроком годности.
- В работе применяйте воду очищенную, соответствующую ФС 42-2619-97.
- Не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгата.
- Стеклянную посуду тщательно мойте и ополаскивайте водой очищенной или используйте одноразовую посуду.
- Аккуратно разводите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металла. Поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и растворами субстратов.
- Используйте для внесения каждой пробы сменный одноразовый наконечник.
- Никогда не используйте одну и ту же емкость, для приготовления конъюгата и раствора ТМБ.
- Проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы.

Исследуемые образцы

Забор крови должен быть произведен согласно стандартной процедуре; полученные образцы плазмы (сыворотки) крови до исследования можно хранить не более 7 сут при

температуре от 2 до 8 °С и не более 3 мес при температуре минус 20 °С или более низкой. Допускается только однократное замораживание-размораживание образцов. Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

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

Оборудование и материалы

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

Одноразовые наконечники на 10-500 мкл.

Автоматические промыватели или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр.

Перчатки резиновые или пластиковые.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная)

Приготовление растворов и реагентов для ИФА

Перед использованием набора все его компоненты выдержать при комнатной температуре в течение 20 мин.

Приготовление контрольных образцов

За 10 мин до проведения ИФА во флакон с лиофилизированным $K^{+}_{\text{слаб}}$ добавить 1,0 мл воды очищенной и аккуратно перемешать.

Разведенный $K^{+}_{\text{слаб}}$ хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С.

K^{+} , жидкий $K^{+}_{\text{слаб}}$ и K^{-} – готовы к использованию.

Приготовление раствора конъюгата

Для постановки ИФА с помощью анализатора

Во флакон с конъюгатом (3,2 мл) внести содержимое флакона с РРК (3,2 мл) и тщательно перемешать.

Для ручной постановки

Конъюгат развести РРК в соотношении 1:1, используя объемы конъюгата и РРК, указанные в табл. 1 для заданного числа стрипов, тщательно перемешать.

Таблица 1

Компоненты	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Конъюгат, мл	0,25	0,45	0,65	0,85	1,05	1,25	1,45	1,65	1,85	2,05	2,25	2,6
РРК, мл	0,25	0,45	0,65	0,85	1,05	1,25	1,45	1,65	1,85	2,05	2,25	2,6

При постановке ИФА на 1 планшете допускается готовить раствор конъюгата, внося во флакон с конъюгатом (3,2 мл) содержимое флакона с РРК (3,2 мл).

Раствор конъюгата хранению не подлежит.

Приготовление ФСБ-Т

При выпадении осадка солей в концентрате перед разведением его прогреть при температуре от 36 до 38 °С до полного растворения осадка.

Для постановки ИФА с помощью анализатора
40,0 мл ФСБ-Т(х25) довести водой очищенной до 1000 мл.

Для ручной постановки

При постановке ИФА на 1 планшете 40,0 мл ФСБ-Т(х25) довести водой очищенной до 1000 мл.

При дробной постановке ФСБ-Т(х25) развести водой очищенной, используя объемы концентрата и воды, указанные в табл. 2 для заданного числа стрипов.

Таблица 2

Компоненты	Количество используемых стрипов						
	1-4	5-6	7-8	9	10	11	12
ФСБ-Т(х25), мл	10	15	20	25	30	35	40
Вода очищенная, мл	240	360	480	600	720	840	960

ФСБ-Т хранить не более 14 сут при температуре от 2 до 8 °С.

Приготовление раствора хромогена

Готовить непосредственно перед использованием в защищенном от прямого солнечного света месте.

Для постановки ИФА с помощью анализатора

1,0 мл ТМБ внести во флакон с 20,0 мл ЦБР. Тщательно перемешать.

Для ручной постановки

При постановке ИФА на 1 планшете 0,6 мл ТМБ внести в 12 мл ЦБР (можно 1,0 мл ТМБ внести во флакон с 20,0 мл ЦБР). Тщательно перемешать.

При дробной постановке ТМБ развести ЦБР, используя объемы реагентов, указанные в табл. 3 для заданного числа стрипов.

Таблица 3

Реагенты	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ТМБ, мл	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6
ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Раствор хромогена хранению не подлежит.

Стоп-реагент готов к использованию.

Неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытой упаковке при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности набора.

Проведение ИФА

Постановка с использованием ИФА-анализатора.

Анализ проводится в соответствии с указаниями инструкции по эксплуатации прибора.

Ручная постановка

В лунку А1 внести 100 мкл K^+ , в лунку В1 – 100 мкл K^+ _{сл}, в лунки С1, D1, Е1 – 100 мкл K^- . В остальные лунки планшета внести по 100 мкл исследуемых образцов.

Во все лунки внести по 50 мкл раствора конъюгата. Содержимое лунок перемешать, аккуратно постукивая по краю планшета. Планшет закрыть крышкой и выдержать в течение 2 ч во влажной камере при температуре 44 °С или 1ч 15 мин на шейкере (500 об/мин) при температуре 44 °С

По окончании инкубации содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором (6% раствор перекиси водорода). Планшет пятикратно промыть ФСБ-Т при помощи вошера или семикратно при помощи многоканальной пипетки, при этом в процессе одного промывания в каждую лунку вносить не менее 370 мкл раствора (до края лунки), затем промыть один раз водой очищенной. Воду из лунок тщательно удалить, постукивая планшетом со стороны лунок по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге.

Внести во все лунки по 100 мкл свежеприготовленного раствора хромогена и выдержать планшет 25 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте или в термостате при температуре 37°C в течение 20 мин. **Планшет крышкой не закрывать!**

Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и не позднее чем через 10 мин после внесения стоп-реагента учесть результаты.

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Перед учетом результатов дно планшета протереть сначала влажной марлей, а затем – насухо. Учет результатов провести на спектрофотометре при длине волны 450 нм или 450/620 нм сразу после добавления стоп-реагента; "нулевой" уровень ("бланк") спектрофотометра вывести по воздуху.

Результаты ИФА учитывать только при выполнении следующих условий:

среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с K⁺ не менее, чем в 4 раза превышает среднее значение ОП в лунках с K⁻;

среднее значение ОП в лунках с K⁻ (ОП_{K⁻ср}) не более 0,150;

среднее значение ОП в лунках с K⁺_{сл} больше критической величины оптической плотности (ОП_{крит}), определяемой по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{K}^{\text{ср}}} + 0,04.$$

В противном случае исследование необходимо повторить.

Исследуемый образец считать положительным, если ОП в лунке с ним больше или равна ОП_{крит}.

Исследуемый образец считать отрицательным, если ОП в лунке с ним меньше ОП_{крит}.

Все положительные при первичном обследовании образцы должны быть исследованы с помощью подтверждающего теста (рекомендуется использование комплекта № 3 набора "ИФА-НВsAg").

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.

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, тел: (49643)3-1374, 3-2311, факс 3-3143, и в ФГУН Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора по адресу: 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел./ (499) 241-39-22, факс (499) 241-92-38

**КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА
"ИФА-НВsAg"
Комплект № 1**

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести	<input type="checkbox"/>	в лунку А1 – 100 мкл К ⁺ ; в лунку В1 – 100 мкл К ^{+_{сл}} ; в лунки С1, D1, Е1 - по 100 мкл К ⁻ ; в остальные лунки планшета - по 100 мкл исследуемых образцов
Внести	<input type="checkbox"/>	во все лунки по 50 мкл рабочего разведения конъюгата
Инкубация	<input type="checkbox"/>	2 ч, 44 °С, – во влажной камере или 1 ч 15 мин, 44 °С, – на шейкере (500 об/мин)
Промыть	<input type="checkbox"/> [<input type="checkbox"/> ... <input type="checkbox"/>	5 раз ФСБ-Т и 1 раз водой очищенной
Внести	<input type="checkbox"/>	по 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку
Инкубация	<input type="checkbox"/>	25 мин, 18-25 °С, или 20 мин, 37 °С
Внести	<input type="checkbox"/>	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	<input type="checkbox"/>	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по воздуху

Образец ИП для комплектации набора ИФА-НВsAg , компл. 1, по Извещению об изменении 1.

Предыдущий образец из обращения изъять!

Начальник ОНД

В.В.Симонов

04.08.2009