

«УТВЕРЖДАЮ»
**Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации**

Г.Г. Онищенко
«16» 2008 г.

№ 01-11/92-10

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов
"ДС-ИФА-НВs Ag-0,01"
тест – система иммуноферментная для выявления или подтверждения
поверхностного антигена вируса гепатита В,
набор диагностический**

«УТВЕРЖДАЮ»
**Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации**
_____ Г. Онищенко
«16» _____ 2009 г.

№ 01-11/92-10

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов
"ДС-ИФА-НВs Ag-0,01"
тест – система иммуноферментная для выявления или подтверждения
поверхностного антигена вируса гепатита В,
набор диагностический**

Содержание

I. Назначение	3
II. Состав набора	3
III. Меры предосторожности	5
IV. Инструкции по безопасности	6
V. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемое с набором реагентов	7
VI. Отбор и подготовка образцов	7
VII. Подготовка реагентов	8
VIII. Проведение анализа	9
IX. Результаты	12
X. Процедура выполнения подтверждающего теста	12
XI. Результаты подтверждающего теста	14
XII. Срок годности. Условия хранения и транспортирования	15
XIII. Объяснение символов на внутренней упаковке	15

Набор реагентов выпускается в виде четырех комплектов.

Комплекты № 1, 2, 3 - для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В:

комплект № 1 рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для одновременной постановки 96 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа;

комплект № 2 рассчитан на проведение 192 (два разборных планшета) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для одновременной постановки 192 (96 x 2) определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа;

комплект № 3 рассчитан на проведение 480 (пять разборных планшетов) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для постановки 480 (96 x 5) определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа;

Комплект № 4 – для выявления и/или подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В

рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений для выявления или 48 определений для подтверждения наличия HBsAg, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу – в случае выявления или по два стрипа – в случае подтверждения наличия HBsAg) использования набора или для одновременной постановки 96 определений для выявления или 48 определений для подтверждения наличия HBsAg на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ДС-ИФА-HBs Ag-0,01» предназначен для выявления или подтверждения поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке (плазме) и препаратах крови (альбумине, фибринолизине, лейкоцитарном интерфероне, иммуноглобулинах) методом иммуноферментного анализа. Возможно выявление и/или подтверждение реакцией нейтрализации как диких типов, так и мутантных вариантов поверхностного антигена вируса гепатита В.

Чувствительность набора при выявлении поверхностного антигена вируса гепатита В - 0,01 МЕ/мл.

II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-HBs Ag-0,01»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска			
	Комплект № 1	Комплект № 2	Комплект № 3	Комплект № 4
Иммуносорбент - полистироловый разборный планшет с прозрачными бесцветными лунками, в которых сорбированы моноклональные антитела мыши к HBsAg (анти-HBs).	1 планшет	2 планшета	5 планшетов	1 планшет
Конъюгат-1 (концентрат x 11) - моноклональные антитела мыши к HBs Ag (анти-HBs) конъюгированные с биотином. Прозрачная или слегка опалесцирующая фиолетового цвета жидкость.	1 флакон 0,75 мл	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 4,0 мл	1 флакон 0,75 мл

Конъюгат-2 (концентрат х 11) - стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Прозрачная или слегка опалесцирующая голубого цвета жидкость.	1 флакон 0,75 мл	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 4,0 мл	1 флакон 0,75 мл
РРК-1 (раствор для разведения конъюгата-1) - непрозрачная зеленого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при встряхивании.	1 флакон 8,0 мл	1 флакон 15,0 мл	2 флакона по 19,0 мл	1 флакон 8,0 мл
РРК-2 (раствор для разведения конъюгата-2) - прозрачная желтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при встряхивании.	1 флакон 8,0 мл	1 флакон 15,0 мл	2 флакона по 19,0 мл	1 флакон 8,0 мл
K ₁ + (контрольный положительный образец) - рекомбинантный HBsAg или очищенный плазменный HBsAg в сыворотке крови человека, не содержащей антитела к HBsAg, ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированной. Прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость.	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 2,0 мл
K ₂ + (контрольный слабоположительный образец) - рекомбинантный HBsAg или очищенный плазменный HBsAg с концентрацией 0,02 ± 0,01 МЕ/мл в сыворотке крови человека, не содержащей антитела к HBsAg, ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированной. Сухая пористая аморфная масса, белого или светло-желтого цвета.	1 флакон	2 флакона	5 флаконов	1 флакон
K- (контрольный отрицательный образец) - сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВИЧ-1,2, HBsAg, антитела к вирусу гепатита С; инактивированная прогреванием. Прозрачная или опалесцирующая зеленого цвета жидкость.	1 флакон 3,0 мл	1 флакон 5,0 мл	1 флакон 5,0 мл	1 флакон 3,0 мл
Промывочный раствор (концентрат х 25). Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании.	1 флакон 50,0 мл	1 флакон 80,0 мл	3 флакона по 80,0 мл или 2 флакона по 120,0 мл	1 флакон 50,0 мл
СБ - субстратный буферный раствор, цитратный буфер, содержащий раствор водорода перекиси, рН 4,2. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл	2 флакона по 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	4 флакона по 25,0 мл или 2 флакона по 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл

Хромоген ТМБ - раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндегидрохлорид. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 2,5 мл	2 флакона по 3,5 мл	1 флакон 1,5 мл
Стоп-реагент - раствор серной кислоты 0,75 моль/л. Прозрачная, бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл	1 флакон 25,0 мл	2 флакона по 25,0 мл или 1 флакон 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл
АНТИ-НВs-ПЛЮС - козьи антитела, содержащие антитела к НВsAg, внесенные в сыворотку крови человека, не содержащую НВsAg, антитела к НВsAg, ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированную. АНТИ-НВs-ПЛЮС - лиофилизированный, сухая пористая аморфная масса, розового цвета или АНТИ-НВs-ПЛЮС - жидкий, прозрачная розового цвета жидкость.	-	-	-	1 флакон или 1 флакон 2,0 мл
АНТИ-НВs-МИНУС - козьи антитела, не содержащие антитела к НВsAg, внесенные в сыворотку крови человека, не содержащую НВsAg, антитела к НВsAg, ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированную. АНТИ-НВs-МИНУС - лиофилизированный, сухая пористая аморфная масса, голубого цвета или АНТИ-НВs-МИНУС - жидкий, прозрачная голубого цвета жидкость.	-	-	-	1 флакон 1 флакон 2,0 мл

Набор упакован в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывается инструкция по применению.

		Комп-лект 1	Комп-лект 2	Комп-лект 3	Комп-лект 4
Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетам	1 шт.	2 шт.	3 шт.	1 шт.
	Одноразовые наконечники	16 шт.	32 шт.	80 шт.	16 шт.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.	4 шт.	10 шт.	2 шт.
	Пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или пакет полиэтиленовый с замком zip-lock.	1 шт.	2 шт.	3 шт.	1 шт.

III. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с температурой от 18 до 24 °С.
- Нельзя использовать реагенты с истекшим сроком годности.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий и смешивать их в процессе приготовления растворов.

- Перед использованием все реагенты выдержать при температуре от 18 до 24° С в течение 30 мин.
- Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить тест в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на ферментативную активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта или предпочтительно использование материалов одноразового использования.
- Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной. Многократные ванночки для автоматических анализаторов необходимо сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной. Затем промыть 70% раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной.
- Посуду для работы с субстратной смесью (ванночки, флаконы и т.д.) в случае повторного использования необходимо сразу после работы промыть 70 % раствором этилового спирта, а затем водой дистиллированной.
- Иммуносорбент допускается хранить в промежутках между отдельными операциями не более 10 мин (нельзя допускать высыхания лунок планшета).
- Ферментативная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстратов.
- Необходимо использовать новый наконечник для каждого образца.
- Промывка лунок - важный этап в данной процедуре: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполнены, не допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.
- Нельзя использовать одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и растворов.
- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование.
- Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- Необходимо использовать воду высокого качества.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию тепла или света во время инкубации и хранения.

IV. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для диагностики “in vitro”.
- Сыворотки (плазма) крови человека, используемые при приготовлении контрольного отрицательного образца, контрольного положительного образца, контрольного слабоположительного образца, АНТИ-НВs-ПЛЮС и АНТИ-НВs-МИНУС были протестированы и определены неактивными в отношении поверхностного антигена гепатита В (НВsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к вирусу гепатита С и ВИЧ-1,2.
- При работе с реагентами набора и исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спец. одежду и одноразовые перчатки, тщательно мыть руки после работы с ними.
- Необходимо избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы. При распыливании немедленно дезактивировать поверхность 3 % раствором хлорамина В.
- Необходимо избегать контакта субстратного буфера, хромогена, стоп-реагента с кожей и слизистыми.

- После проведения ферментативной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в сточную трубу. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства (СМС) или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дез. средства. Твёрдые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.



- **Xi** Некоторые реагенты содержат 0,05 % Проклин 300. Проклин 300 0,05 % - раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промойте область контакта большим количеством мыла и воды.

V. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМОЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Вода дистиллированная.
- Автоматические или полуавтоматические, регулируемые или предварительно устанавливаемые одноканальные или многоканальные пипетки с изменяемым объемом для отбора жидкостей.
- Одноразовые наконечники к пипеткам.
- Инкубатор микропланшетный или термостатируемый шейкер (42,0 ± 0,5) °С.
- Автоматический микропланшетный вошер.
- Градуированные цилиндры: 25 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Микропланшетный ридер с возможностью измерения оптической плотности (ОП) при фильтрах 450 нм и 620-680 нм.
- При проведении анализа на автоматическом анализаторе для ИФА на планшетах - автоматический анализатор открытого типа (например «TECAN Freedom EVolyser» производства фирмы «TECAN»).

VI. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови должен проводиться в соответствии с текущей практикой. В качестве исследуемых образцов могут быть использованы сыворотка (плазма) крови человека или препараты крови. Сыворотку от эритроцитов или плазму от сгустка следует отделить как можно быстрее, чтобы избежать гемолиза. Гемолиз может повлиять на рабочие характеристики теста. Образцы, содержащие видимые частицы, следует осветлить центрифугированием до проведения теста. Взвешенные частицы фибрина и агрегаты могут привести к ложноположительным результатам.

Жидкие препараты крови исследовать неразведенными; лиофильно высушенные препараты крови перед исследованием развести в соответствии с инструкцией по применению данного препарата.

Образцы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут, допустимо длительное хранение в замороженном состоянии при температуре минус 20 °С в течении 3 мес. Во избежание осаждения фибрина сыворотку (плазму) следует быстро размораживать в течение нескольких минут при температуре 40 °С в водяной бане. Нельзя использовать сыворотку (плазму), замороженную и размороженную более одного раза. Нельзя использовать

сыворотку (плазму) загрязненную, с гемолизом, или гиперлипидемией или консервированную азидом натрия.

VII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:

- К- - контрольный отрицательный образец
- К₁+ - контрольный положительный образец
- РРК-1 - раствор для разведения конъюгата-1
- РРК-2 - раствор для разведения конъюгата-2
- АНТИ-НВs-ПЛЮС (нейтрализующий реагент), жидкий
- АНТИ-НВs-МИНУС (контрольный реагент), жидкий
- Стоп-реагент

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

Иммуносорбент. Каждый планшет, состоящий из 12 стрипов, упакован в фольгированный пакет. Вскрыть пакет и вынуть планшет. Взять нужное количество стрипов.

Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать (не удаляя осушитель!). Для этого поместить вскрытый пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или край пакета с иммуносорбентом свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета.

Рабочий промывочный раствор (ПР). Содержимое флакона с концентратом (x 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимый объем концентрата (x 25) промывочного раствора развести соответствующим объемом воды дистиллированной (см. табл. № 2 и 4). Полученный раствор тщательно перемешать. Приготовленный рабочий промывочный раствор стабилен в течение 3 сут при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

Рабочий раствор Конъюгата-1. Для приготовления рабочего раствора Конъюгата-1 необходимый объем концентрата (x 11) Конъюгата-1 развести соответствующим объемом РРК-1 (см. табл. № 2 и 4). Полученный раствор осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Рабочий раствор конъюгата-1 стабилен не более 12 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

Рабочий раствор Конъюгата-2. Для приготовления рабочего раствора Конъюгата-2 необходимый объем концентрата (x 11) Конъюгата-2 развести соответствующим объемом РРК-2 (см. табл. № 2 и 4). Полученный раствор осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!). Рабочий раствор конъюгата-2 стабилен не более 12 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

Субстратная смесь (СС). Готовить перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (см. табл. № 2 и 4), тщательно перемешать до полного растворения. Допустимо хранение СС не более 10 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в химически чистых флаконах или специальной емкости, предназначенной для постановки ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

Контрольный слабоположительный образец (К₂+). Содержимое флакона растворить в объеме воды дистиллированной, указанном на этикетке флакона. Осторожно перемешать и выдержать до использования 5-10 мин. Контрольный слабоположительный образец хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 24 °С. **Титрование слабоположительного контрольного образца и растворение его в других объемах воды дистиллированной не производить!**

Раствор нейтрализующего реагента АНТИ-НВs-ПЛЮС. Содержимое флакона (или ампулы) с лиофилизированным АНТИ-НВs-ПЛЮС растворить в объеме воды дистиллированной, указанном на этикетке флакона. Срок годности приготовленного раствора - не более 1 мес при температуре от 2 до 8 °С. При дробном использовании набора на протяжении более длительного срока приготовленный раствор разделить на части и неиспользованные аликвоты хранить под плотно закрытой пробкой в замороженном состоянии на протяжении срока годности тест-системы при температуре не выше минус 10 °С (не допускается замораживание и оттаивание реагента более 1 раза).

Раствор контрольного реагента - АНТИ-НВs-МИНУС. Содержимое флакона (или ампулы) с лиофилизированным АНТИ-НВs-МИНУС растворить в объеме воды дистиллированной, указанном на этикетке флакона. Срок годности приготовленного раствора - не более 1 мес при температуре от 2 до 8 °С. При дробном использовании набора на протяжении более длительного срока приготовленный раствор разделить на части и неиспользованные аликвоты хранить под плотно закрытой пробкой в замороженном состоянии на протяжении срока годности тест-системы при температуре не выше минус 10 °С (не допускается замораживание и оттаивание реагента более 1 раза).

3. Хранение неиспользованных реагентов

После вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными реагенты допускается хранить: ПР (концентрат x 25), К₁+, К-, РРК-1, РРК-2, конъюгат-1, конъюгат-2, СБ, ТМБ, стоп-реагент, АНТИ-НВs-ПЛЮС (жидкий), АНТИ-НВs-МИНУС (жидкий) - во флаконах, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. Иммуносорбент после вскрытия пакета допускается хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблице 2:

Таблица 2

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов при ручной постановке ИФА

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Субстратная смесь	
	ПР (конц. x 25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат-1,2 (конц. x 11) (мл)	Раствор для разведения конъюгата-1,2 (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
1	3,0	72,0	0,05	0,5	0,1	1,5
2	6,0	144,0	0,1	1,0	0,2	3,0
3	9,0	216,0	0,15	1,5	0,3	4,5
4	12,0	288,0	0,2	2,0	0,4	6,0
5	15,0	360,0	0,25	2,5	0,5	7,5
6	18,0	432,0	0,3	3,0	0,6	9,0
7	21,0	504,0	0,35	3,5	0,7	10,5
8	24,0	576,0	0,4	4,0	0,8	12,0
9	27,0	648,0	0,45	4,5	0,9	13,5
10	30,0	720,0	0,5	5,0	1,0	15,0
11	33,0	792,0	0,55	5,5	1,1	16,5
12 (целый планшет)	40,0	960,0	0,7	7,0	1,2	18,0

Процедуры выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBs Ag) в сыворотке, плазме и препаратах крови

Процедура	Образцы	Образцы, конъюгат-1	Образцы, конъюгат-1, конъюгат-2	Субстратная смесь
1. Термостат	30 мин (42,0±0,5) °С	45 мин (42,0±0,5) °С	45 мин (42,0±0,5) °С	25 мин 18-24 °С
2. Термостатируемый шейкер	-	40 мин, 500 об/мин (42,0±0,5) °С	20 мин, 500 об/мин (42,0±0,5) °С	

Проведение ИФА

1. Перед использованием иммуносорбент промыть 3 раза рабочим ПР: осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета с помощью промывочного устройства до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек, затем удалить промывочный раствор в емкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использовать автоматический микропланшетный вошер. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.

2. В зависимости от количества используемых стрипов рекомендуется вносить контрольные образцы по 100 мкл в каждую лунку по следующей схеме:

1-2 стрипа: 1 лунка - контрольный положительный образец (K₁+), 2 лунки - контрольный слабopоложительный образец (K₂+), 2 лунки - контрольный отрицательный образец (K-).

3 стрипа и более: 1 лунка - контрольный положительный образец (K₁+), 3 лунки - контрольный слабopоложительный образец (K₂+), 4 лунки - контрольный отрицательный образец (K-).

Контрольный слабopоложительный образец используют для контроля чувствительности тест – системы. Чувствительность тест – системы определяют в одном из 12-ти стрипов иммуносорбента.

В остальные лунки внести по 100 мкл цельных исследуемых образцов.

3. Внимание! При использовании шейкера данный пункт 3. не применять, выполнять п. 4!

Покрытый крышкой планшет выдержать в термостате в течение 30 мин при температуре (42,0±0,5) °С в условиях влажной камеры (в качестве влажной камеры может быть использован полиэтиленовый пакет с вложенной в него ватой (марлей) или фильтровальной бумагой, смоченной водой).

4. Не удаляя содержимое лунок и не промывая планшет, во все лунки стрипов внести пипеткой по 50 мкл рабочего раствора конъюгата-1, окрашенного в зеленый цвет. При этом содержимое лунок изменяет свой цвет на серый. Допускается изменение цвета раствора в лунке на ярко-желтый (в случае, если тестируемый образец имеет кислое значение pH). При добавлении конъюгата-1 не следует допускать случайного заноса образца из одного стрипа в другой через наконечники. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета, после чего покрытый крышкой планшет выдержать в термостате в течение 45 мин при температуре (42,0±0,5) °С в условиях влажной камеры. При инкубации на шейкере - планшет выдержать 40 мин на шейкере при скорости 500 об/мин и температуре (42,0±0,5) °С.

5. Не удаляя содержимое лунок и не промывая планшет, во все лунки стрипов внести пипеткой по 50 мкл рабочего раствора конъюгата-2. При добавлении конъюгата-2 не следует допускать случайного заноса образца из одного стрипа в другой через наконечники. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета, после чего покрытый крышкой планшет выдержать в термостате в течение 45 мин при температуре (42,0±0,5) °С в

условиях влажной камеры. При инкубации на шейкере - планшет выдержать 20 мин на шейкере при скорости 500 об/мин и температуре (42,0±0,5) °С.

6. Удалить содержимое лунок и промыть планшет 7 раз рабочим промывочным раствором, как описано в пункте 1.

7. Во все лунки планшета внести по 150 мкл субстратной смеси. Планшет выдержать 25 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

8. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 50 мкл стоп – реагента и через 2-3 мин провести учет результатов при 450/620-680 нм, используя фотометр для микропланшет. Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм.

9. Проведение анализа в автоматическом режиме на автоматическом анализаторе типа «ТЕСАН Freedom EVOlyzer» производства фирмы «ТЕСАН», Швейцария (возможна постанковка на других моделях ИФА - анализаторов открытого типа).

Таблица 4

Расход реагентов тест-системы на один планшет при постанковке ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Субстратная смесь	
	ПР (конц. x25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)	Конъюгат-1,2 (конц. x11) (мл)	Раствор для разведения конъюгата-1,2 (мл)	ТМБ	СБ (мл)
12 (целый планшет)	40,0	960,0	0,7	7,0	1,2	18,0

1. Задают программу проведения ИФА и включают анализатор.
2. Приготовленный рабочий промывочный раствор заливают в предназначенную для него емкость (входящую в комплект к ИФА-анализатору), остальные рабочие растворы и реагенты помещают в специальные контейнеры или емкости. Флаконы с контрольными образцами K₁⁺, K₂⁺ и K⁻, и флаконы или пробирки с исследуемыми образцами в объеме не менее 300 мкл устанавливают в соответствующие штативы анализатора. В анализатор помещают необходимое количество планшетов. Далее постанковку проводить в соответствии с инструкцией по применению ИФА-анализатора и программой проведения ИФА.
3. По окончании анализа прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов K₁⁺, K₂⁺ и K⁻.
4. Результаты анализа учитывать, если значение ОП в лунке с контрольным положительным образцом (K₁⁺) не менее 0,6, а среднее значение в лунках с контрольным отрицательным образцом (K⁻) не более 0,12. Далее учет результатов проводить аналогично разделу IX.

IX. РЕЗУЛЬТАТЫ

Присутствие или отсутствие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) определяется отношением оптической плотности, измеряемой для каждого образца, к расчетной величине критической оптической плотности (ОПкрит.).

Результаты анализа учитывать, если значение ОП в лунке с контрольным положительным образцом (K₁+) не менее 0,6, а среднее значение в лунках с контрольным отрицательным образцом (K-) не более 0,12. Если одно из значений ОП контрольного отрицательного образца выходит за этот предел, его следует исключить из расчета среднего значения. Если исключению подлежат более одного значения ОП контрольного отрицательного образца, то анализ следует повторить. Контрольный слабоположительный образец (K₂+) должен давать положительную реакцию.

ОПкрит. рассчитывается по формуле:

$$\text{ОПкрит.} = \text{ОП среднее контрольного отрицательного образца} + A,$$

где A – коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе, величину которого указывают для каждой серии в инструкции по применению, вкладываемой в коробку с набором и в паспорте на серию данного препарата*.

Исследуемые образцы расцениваются как отрицательные: если ОП образца < ОПкрит.

Исследуемые образцы расцениваются как положительные: если ОП образца ≥ ОПкрит.

Положительные образцы должны быть исследованы повторно в двух лунках для подтверждения первоначального результата. Если при повторном исследовании величина ОП образца в обеих лунках меньше ОПкрит., то проба расценивается как негативная по HBsAg. Если при повторном анализе величина ОП образца в одной из лунок равна или больше ОПкрит., то исходный результат подтверждается. Все повторно положительные образцы должны быть протестированы в подтверждающем тесте, основанном на реакции нейтрализации.

* «Для серии № _____ величина коэффициента A _____»

X. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ ПОДТВЕРЖДАЮЩЕГО ТЕСТА

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или планшета представлены в таблице 2 (раздел VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА).

Перед началом работы в зависимости от числа подлежащих подтверждению образцов определяют необходимое количество стрипов иммуносорбента, при этом следует учесть, что для подтверждения одного образца необходимы две лунки. При дробной постановке ИФА возможно использовать минимум два стрипа, один из которых (8 лунок) необходим для постановки контрольных образцов, а другой (8 лунок) – для подтверждения присутствия HBsAg в 4-х исследуемых образцах.

В зависимости от количества используемых стрипов вносить контрольные образцы по 100 мкл в каждую лунку по следующей схеме:

2 стрипа: 4 лунки - контрольный отрицательный образец (K-), 3 лунки - контрольный положительный образец (K₁+), 1 лунка - контрольный слабоположительный образец (K₂+).

3 стрипа и более: 5 лунок - контрольный отрицательный образец (K-), 3 лунки - контрольный положительный образец (K₁+), 2 лунки - контрольный слабоположительный образец (K₂+).

Чувствительность теста по контрольному слабоположительному образцу (K₂+) определяют только в одном из 12 стрипов иммуносорбента.

Схема внесения реагентов на 2-х стрипах

	1	2
A	K-	Образец 1, АНТИ-НВs-МИНУС
B	K-	Образец 1, АНТИ-НВs-ПЛЮС
C	K-, АНТИ-НВs-МИНУС	Образец 2, АНТИ-НВs-МИНУС
D	K-, АНТИ-НВs-ПЛЮС	Образец 2, АНТИ-НВs-ПЛЮС
E	K ₁ +	Образец 3, АНТИ-НВs-МИНУС
F	K ₁ +, АНТИ-НВs-МИНУС	Образец 3, АНТИ-НВs-ПЛЮС
G	K ₁ +, АНТИ-НВs-ПЛЮС	Образец 4, АНТИ-НВs-МИНУС
H	K ₂ +	Образец 4, АНТИ-НВs-ПЛЮС

Схема внесения реагентов на 3-х стрипах и более

	1	2	3
A	K-	K ₂ +	Образец 4, АНТИ-НВs-МИНУС
B	K-	K ₂ +	Образец 4, АНТИ-НВs-ПЛЮС
C	K-	Образец 1, АНТИ-НВs-МИНУС	Образец 5, АНТИ-НВs-МИНУС
D	K-, АНТИ-НВs-МИНУС	Образец 1, АНТИ-НВs-ПЛЮС	Образец 5, АНТИ-НВs-ПЛЮС
E	K-, АНТИ-НВs-ПЛЮС	Образец 2, АНТИ-НВs-МИНУС	Образец 6, АНТИ-НВs-МИНУС
F	K ₁ +	Образец 2, АНТИ-НВs-ПЛЮС	Образец 6, АНТИ-НВs-ПЛЮС
G	K ₁ +, АНТИ-НВs-МИНУС	Образец 3, АНТИ-НВs-МИНУС	Образец 7, АНТИ-НВs-МИНУС
H	K ₁ +, АНТИ-НВs-ПЛЮС	Образец 3, АНТИ-НВs-ПЛЮС	Образец 7, АНТИ-НВs-ПЛЮС

Проведение Подтверждающего теста

1. Перед использованием иммуносорбент промыть 3 раза рабочим ПР: осторожно внести рабочий ПР в лунки планшета с помощью промывочного устройства до краев лунок (не менее 380 мкл в лунку), выдержать 40 сек, затем удалить промывочный раствор в емкость с дезинфицирующим раствором. Рекомендуется использование автоматического микропланшетного вошера. Недостаточная промывка может неблагоприятно повлиять на точность анализа.

2. Внести в лунки микропланшета по 100 мкл контрольного отрицательного образца (K-), контрольного положительного образца (K₁+) и контрольного слабоположительного образца (K₂+) согласно схеме в зависимости от количества используемых стрипов. В остальные лунки внести по 100 мкл повторно реактивных образцов, каждый образец внести в 2 лунки планшета (1 лунку используют для внесения АНТИ-НВs-МИНУС, 1 лунку – для АНТИ-НВs-ПЛЮС). АНТИ-НВs-МИНУС и АНТИ-НВs-ПЛЮС внести по 25 мкл в лунки иммуносорбента согласно схеме.

3. Внимание! При использовании шейкера данный пункт 3. не применять, выполнять п.4! Покрытый крышкой планшет выдержать в термостате в течение 30 мин при температуре (42,0±0,5) °С в условиях влажной камеры (в качестве влажной камеры может быть использован полиэтиленовый пакет с вложенной в него ватой (марлей) или фильтровальной бумагой, смоченной водой).

4. Не удаляя содержимое лунок и не промывая планшет, во все лунки стрипов внести пипеткой переменного объема по 50 мкл рабочего раствора конъюгата-1, окрашенного в зеленый цвет. При этом содержимое лунок изменяет свой цвет на серый. Допускается изменение цвета раствора в лунке на ярко-желтый (в случае, если тестируемый образец имеет кислое значение pH). При добавлении конъюгата-1 не следует допускать случайного заноса образца из одного стрипа в другой через наконечники. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета, после чего покрытый крышкой планшет выдержать в термостате в течение 45 мин при температуре (42,0±0,5) °С в условиях влажной камеры. При инкубации на шейкере - планшет выдержать 40 мин на шейкере при скорости 500 об/мин и температуре (42,0±0,5) °С.

5. Не удаляя содержимое лунок и не промывая планшет, во все лунки стрипов внести пипеткой переменного объема по 50 мкл рабочего раствора конъюгата-2. При добавлении конъюгата-2 не следует допускать случайного заноса образца из одного стрипа в другой через наконечники. Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета, после чего покрытый крышкой планшет выдержать в термостате в течение 45 мин при температуре $(42,0 \pm 0,5)$ °С в условиях влажной камеры. При инкубации на шейкере - планшет выдержать 20 мин на шейкере при скорости 500 об/мин и температуре $(42,0 \pm 0,5)$ °С.

6. Удалить содержимое лунок и промыть планшет 7 раз рабочим промывочным раствором, как описано в пункте 1.

7. Во все лунки планшета внести по 150 мкл субстратной смеси. Планшет выдержать 25 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

8. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 50 мкл стоп – реагента и через 2-3 мин провести учет результатов при 450/620-680 нм, используя фотометр для микропланшет. Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм.

9. Проведение анализа в автоматическом режиме на автоматическом анализаторе типа «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN», Швейцария (возможна постройка на других моделях ИФА-анализаторах открытого типа).

Необходимые объемы реагентов в зависимости от количества используемых стрипов или целого планшета представлены в таблице 4, раздел VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

Постановку проводить аналогично п.9., раздел VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

XI. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОДТВЕРЖДАЮЩЕГО ТЕСТА

Оценку валидности проведения теста по оптической плотности отрицательного контрольного образца, положительного контрольного образца и слабоположительного контрольного образца проводить согласно пункту IX. Значения ОП в лунках с К- после внесения АНТИ-НВs-МИНУС и АНТИ-НВs-ПЛЮС должны быть ниже ОП_{крит}.

В подтверждающем тесте присутствие поверхностного антигена гепатита В (НВsAg) в исследуемых образцах и K_1+ определяется показателем нейтрализации - это соотношение значений оптической плотности образца после нейтрализации и значений оптической образца до нейтрализации. Показатель нейтрализации (%) определяется по формуле:

$$\frac{(ОП_k - ОП_n)}{(ОП_k - ОП_{K-ср})} \times 100\%, \text{ где}$$

ОП_к - оптическая плотность образца после внесения АНТИ-НВs-МИНУС;

ОП_н - оптическая плотность образца после внесения АНТИ-НВs-ПЛЮС;

ОП_{к-ср} - среднее значение оптической плотности контрольного отрицательного образца.

Образец считается положительным если:

1. $ОП_k \geq ОП_{крит}$.

2. показатель нейтрализации $\geq 50 \%$.

Показатель нейтрализации ОП K_1+ должен быть $\geq 50 \%$.

Образец с ОП $\geq 1,0$, не подвергшийся нейтрализации, следует развести в 25 раз рабочим промывочным раствором и повторить тестирование. Если после разведения в 25 раз сохраняются высокие значения ОП и образец не подвергается нейтрализации, то рекомендуется развести исходный образец в 50 раз и более (100, 200 и т.д.) и снова провести анализ. Если образец, разведенный в 50 и более раз, подвергается нейтрализации более чем на 50 %, то его следует считать положительным. Если показатель нейтрализации менее 50 % считать образец отрицательным.

ХII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности - 24 месяца. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

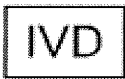
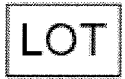
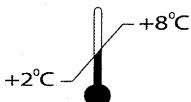


Хранение - в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование - при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование от 9 до 20 °С и не более 10 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу Россия 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел.: (499) 241-39-22, факс: (499) 241-92-38 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, Нижний Новгород, ул. Яблонева, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

E-mail: info@npods.nnov.ru , www.npods.ru.

ХIII. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ на внутренней упаковке

	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Содержит раздражающее вещество

Директор по производству
ООО «Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»



В. К. Пименов