
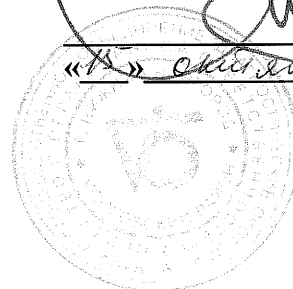


УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические
системы»


И.Е. Колосов
«1» октября 2010 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
“ИФА-НВsAg-подтверждающий тест”
Тест для подтверждения специфичности выявления НВsAg
иммуноферментным анализом

Содержание

I. Назначение	3
II. Состав набора	3
III. Меры предосторожности	3
IV. Инструкции по безопасности	4
V. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемое с набором реагентов	5
VI. Отбор и подготовка образцов	5
VII. Подготовка реагентов	5
VIII. Проведение анализа	6
IX. Результаты	8
X. Срок годности. Условия хранения и транспортирования	8
XI. Объяснение символов на внутренней упаковке	9

Набор реагентов выпускается в виде двух комплектов.

Комплект № 1 - рассчитан на проведение 200 определений, включая контрольные.

Комплект № 2 – рассчитан на проведение 40 определений, включая контрольные.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов “ИФА-НВsAg-подтверждающий тест” предназначен для подтверждения специфичности результатов выявления НВsAg в ИФА.

Добавление нейтрализующего реагента – АНТИ-НВs-ПЛЮС в лунку с контрольным положительным образцом (из тест-систем для определения НВsAg) и образцами, содержащими НВsAg приводит к специфической нейтрализации НВsAg, что выражается в снижении значений оптической плотности (ОП) в 2 и более раз по сравнению с ОП образца после добавления контрольного реагента – АНТИ-НВs-МИНУС.

II. СОСТАВ НАБОРА «ИФА-НВsAg-подтверждающий тест»

Таблица 1

Характеристика реагентов	Форма выпуска	
	Комплект № 1	Комплект № 2
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.	5 флаконов	2 флакона
АНТИ-НВs-ПЛЮС - лиофилизированный, сухая пористая аморфная масса, розового цвета или	1 флакон 5,0 мл	1 флакон 1,0 мл
АНТИ-НВs-ПЛЮС - жидкий, прозрачная розового цвета жидкость.		
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.	5 флаконов	2 флакона
АНТИ-НВs-МИНУС - лиофилизированный, сухая пористая аморфная масса, голубого цвета или	1 флакон 5,0 мл	1 флакон 1,0 мл
АНТИ-НВs-МИНУС - жидкий, прозрачная голубого цвета жидкость.		

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

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).
- 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.
 - 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.
 - 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 (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении АНТИ-НВs-ПЛЮС, АНТИ-НВs-МИНУС, были протестированы и определены неактивными в отношении поверхностного антигена гепатита В (НВsAg), антигена р24 ВИЧ-1 и антител к гепатиту 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 промывать руки после работы с ними.
 - Необходимо избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы. При распыливании немедленно дезактивировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.
 - 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.

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 ($42,0 \pm 0,5$) °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 EVOlyzer» 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.

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 течение 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.

VI. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, требующие предварительного приготовления

Раствор нейтрализующего реагента АНТИ-НВs-ПЛЮС. Содержимое флакона 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 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).

При комплектации набора жидкими компонентами нейтрализующий и контрольный реагенты готовы к применению.

2. Растворы для проведения ИФА готовят в соответствии с инструкциями по применению тест систем.

3. Хранение неиспользованных реагентов

После вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными реагенты допускается хранить: 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.

VIII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Вариант 1. На примере тест-системы «ДС-ИФА-НВsАg».

Подготовку иммуносорбента и внесение контрольных образцов (К+1 и К-) осуществляют в соответствии с инструкцией по применению тест-системы «ДС-ИФА-НВsАg». ОП лунок с контрольным отрицательным образцом используют далее для подсчёта среднего значения ОП К- (ОП К- ср.) и значения ОП критического (ОП крит.).

Для контроля подтверждающего теста дополнительно в 2 лунки иммуносорбента внести по 150 мкл К+1 и в 2 лунки – по 150 мкл К-. Каждый образец, подлежащий подтверждению, также внести по 150 мкл в 2 лунки. В первые лунки с контрольными и исследуемыми образцами добавить по 25 мкл контрольного реагента - АНТИ-НВs-МИНУС, во вторые лунки – по 25 мкл нейтрализующего реагента - АНТИ-НВs-ПЛЮС. Далее во все использованные лунки добавить по 50 мкл конъюгата. При добавлении конъюгата не следует допускать случайного заноса сыворотки из одного стрипа в другой. Занос образцов можно избежать, меняя наконечники перед внесением конъюгата в каждый стрип, или используя для выполнения подтверждающего теста вариант 2. После внесения конъюгата, содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краю планшета, после чего покрытый крышкой планшет выдержать в термостате в течение 2 ч при температуре (42±0,5) °С в условиях влажной камеры; при наличии термостатируемого шейкера, планшет без крышки выдержать 1 ч 15 минут на шейкере при скорости 500 об/мин и температуре (42±0,5) °С.

Последующие этапы ИФА выполняют в соответствии с инструкцией по применению тест-системы «ДС-ИФА-НВsАg».

Схема внесения реагентов в лунки иммуносорбента при выполнении подтверждающего теста по варианту 1 приведена в виде табл. 1.

Таблица 1

Схема внесения реагентов по варианту 1.

№ лунки	Реагенты					
	К+ (мкл)	К- (мкл)	Образец (мкл)	АНТИ-НВs-МИНУС (мкл)	АНТИ-НВs-ПЛЮС (мкл)	Конъюгат (мкл)
1А		150		25		50
2А		150			25	50
1В	150			25		50
2В	150				25	50
1С			150	25		50
2С			150		25	50

1D			150	25		50
2D			150		25	50

Вариант 2.

Вариант 2 предусматривает отличную от варианта 1 последовательность внесения компонентов реакции с целью устранения возможности заноса образцов из одного стрипа в другой, а именно, во все используемые лунки иммуносорбента первым вносится конъюгат, затем реагенты подтверждающего теста и последними – контрольные и исследуемые образцы.

Подготовку иммуносорбента осуществляют, как описано в инструкции по применению тест-системы «ДС-ИФА-НВsAg», после чего во все предполагаемые к использованию лунки иммуносорбента вносят по 50 мкл конъюгата, затем в лунки с конъюгатом закапывают контрольные образцы (количество лунок с К+1 и К- определено в инструкции по применению тест-системы «ДС-ИФА-НВsAg», ОП лунок с отрицательным контрольным образцом используют далее для подсчёта ОП К- ср и ОП крит.). В эти лунки с контрольными образцами реагенты подтверждающего теста не добавляют.

Для подтверждения каждого результата используют, как и в варианте 1 по 2 лунки. В первые лунки с конъюгатом для контрольных и исследуемых образцов добавляют по 25 мкл контрольного реагента - АНТИ-НВs-МИНУС, во вторые лунки для этих образцов – по 25 мкл нейтрализующего реагента – АНТИ-НВs-ПЛЮС. Далее в 2 лунки с контрольным и нейтрализующим реагентом добавляют по 150 мкл К+1 и в 2 лунки – по 150 мкл К- (для контроля подтверждающего теста). В остальные лунки добавляют по 150 мкл исследуемых образцов – каждый образец – в 2 лунки – в лунку с контрольным реагентом и в лунку с нейтрализующим реагентом.

Схема внесения реагентов в лунки иммуносорбента при выполнении подтверждающего теста по варианту 2 приведена в виде табл. 2.

Таблица 2

Схема внесения реагентов по варианту 2

№ лунки	Реагенты					
	Конъюгат (мкл)	АНТИ-НВs-ПЛЮС (мкл)	АНТИ-НВs-МИНУС (мкл)	К+ (мкл)	К- (мкл)	Образец (мкл)
1А	50	25			150	
2А	50		25		150	
1В	50	25		150		
2В	50		25	150		
1С	50	25				150
2С	50		25			150
1D	50	25				150
2D	50		25			150

При использовании в подтверждающем тесте других иммуноферментных тест-систем для определения НВsAg, объёмы вносимых в лунки контрольных и исследуемых образцов должны соответствовать величинам, рекомендуемым в инструкциях по их применению. При этом объёмы вносимых в лунки контрольного и нейтрализующего реагентов для разных тест-систем одинаковы (25 мкл). Параметры этапов ИФА (длительность и температурный режим) также должны соответствовать рекомендуемым в инструкциях, по применению используемых в подтверждающем тесте иммуноферментных тест-систем.

IX. РЕЗУЛЬТАТЫ

Учет результатов провести спектрофотометрически при двух длинах волн – 450 нм и при референс-длине волны в диапазоне от 620 до 680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учёт результатов при одной длине волны - 450 нм.

Реакцию учитывают, если значения оптической плотности (ОП) в лунках с контрольными образцами без добавления контрольного или нейтрализующего реагентов соответствуют требованиям, изложенным в инструкции по применению тест-системы. ОП крит. рассчитывают по формуле, приведенной в инструкции к используемой тест-системе.

Присутствие поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в исследуемых образцах и контрольных положительных образцах определяется показателем нейтрализации - это соотношение значений оптической плотности образца после нейтрализации и значений оптической плотности образца до нейтрализации.

Показатель нейтрализации (%) определяется по формуле:

$$\frac{(ОПк - ОПн)}{(ОПк - ОП К-ср)} \times 100\%,$$

где ОПк - оптическая плотность образца после внесения АНТИ-HBs-МИНУС;

ОПн - оптическая плотность образца после внесения АНТИ-HBs-ПЛЮС;

ОП К-ср - среднее значение оптической плотности контрольного отрицательного образца.

Образец считается положительным если:

1. $ОПк \geq ОПкрит.$
2. показатель нейтрализации $\geq 50 \%$.

Показатель нейтрализации оптической плотности контрольного положительного образца 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.

X. 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.

XI. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ на внутренней упаковке

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

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



В. К. Пименов

Врио Зав. лабораторией трансфузионных
 гепатитов и контаминантов
 ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича
 Роспотребнадзора, к.б.н.

Е. Л. Постнова