УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от «___» _____ 2010г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
_____ Швырев М.В.
« 24 » ноября 2010г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ПОДТВЕРЖДЕНИЯ
НАЛИЧИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий»)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» предназначен для иммуноферментного подтверждения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке и плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа. Образцы, давшие положительный результат в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg» производства ООО «Компания Алкор Био», рекомендуется проверить в реакции нейтрализации специфическими антителами в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий». Подтверждение наличия HBsAg в сыворотке и плазме крови служит для элиминации ложноположительных результатов.

1.2. Поверхностный антиген (HBsAg) представляет собой гликозилированный белок оболочки HBV и является важным маркером инфицирования. HBsAg содержит детерминанту «а», общую для всех субтипов и дополнительные субдетерминанты (d и y), обуславливающие иммунологические различия подгрупп (ad и ay). В настоящее время это основной маркер при определении инфицирования вирусом гепатита В. HBV вызывает острый и хронический вирусный гепатит и чаще других вирусных гепатитов передается при переливании крови. Он вызывает целый спектр проявлений, варьирующих от мягкой, бессимптомной формы до молниеносного гепатита, серьезных поражений печени и цирроза. Кроме того, ясно доказана роль HBV в развитии первичного рака печени.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 44 неизвестных, трех контрольных проб (отрицательной, низкоположительной и положительной) и 1 пробы для определения оптической плотности в растворе тетраметилбензидина (ТМБ), всего 48 определений, при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Примечание: *в случае дробного применения набор может быть использован только в течение 1 месяца после вскрытия компонентов набора.*

Информация получена с официального сайта федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе реагентов «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» использован сэндвич-вариант твердофазного иммуно-ферментного анализа, дополненный стадией преинкубации образцов с контрольным и нейтрализующим буфером. Образцы наносят в чистые стрипы в дубликатах, при этом в одну лунку добавляют контрольный буфер, не содержащий специфических антител (нечетные стрипы), а в другую – нейтрализующий буфер, содержащий специфические антитела к HBsAg (четные стрипы). После преинкубации содержимое чистых стрипов переносят в стрипы с иммобилизованными на внутренней поверхности антителами к HBsAg и добавляют конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза.

Если в образце присутствует HBsAg, во время преинкубации в лунках с нейтрализующим буфером происходит связывание HBsAg со специфическими антителами, в лунках с контрольным буфером HBsAg остается «свободным». Таким образом, после инкубации с нейтрализующим буфером, доступный HBsAg, способный образовывать комплексы с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней стороне лунок сенсибилизированного планшета, и с конъюгатом анти-HBsAg, присутствует в меньшем количестве, чем после инкубации с контрольным буфером (Рисунок 1).

В отсутствие HBsAg в образце, формирование иммунных комплексов со специфическими антителами нейтрализующего буфера, равно как и в контрольном буфере, не происходит.

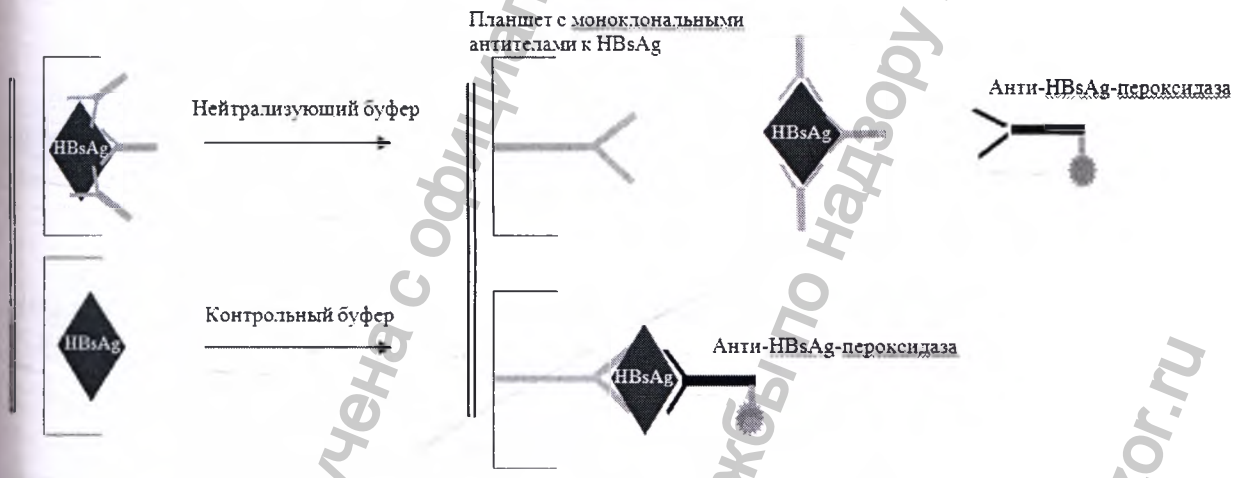

Рисунок 1. Схема анализа

После измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках вычисляется коэффициент нейтрализации, как отношение ОП в лунке с нейтрализующим буфером, к ОП в лунке с контрольным буфером. Если коэффициент нейтрализации меньше или равен 50%, то присутствие HBsAg в образце считают подтвержденным, если же больше 50% - то образец признается отрицательным.

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов чистых в рамке, маркирован «Стрипы чистые» – 1 упаковка;
- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к HBsAg» – 1 упаковка;
- отрицательная контрольная проба (ОКП), на основе сыворотки крови, или водно-солевого раствора, не содержащая рекомбинантный HBsAg, маркирована «Отрицательная контрольная проба» - 1 флакон (1 мл);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

• слабоположительная контрольная проба (СКП), на основе сыворотки крови, или водно-солевого раствора, содержащая рекомбинантный HBsAg, маркирована «Слабоположительная контрольная проба» - 1 флакон (1 мл);

• положительная контрольная проба (ПКП) на основе сыворотки крови, или водно-солевого раствора, содержащая рекомбинантный HBsAg, маркирована «Положительная контрольная проба» - 1 флакон (1 мл);

• контрольный водно-солевой раствор, содержащий суммарные кроличьи IgG, маркирован «Контрольный буфер» - 1 флакон (2,5 мл);

• нейтрализующий водно-солевой раствор, содержащий поликлональные кроличьи антитела к HBsAg, маркирован «Нейтрализующий буфер» - 1 флакон (2,5мл);

• конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» – 1 флакон (8 мл);

• аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» — 1 флакон (6 мл);

• водно-солевой раствор для разведения анализируемых образцов, маркирован «Буфер Д» - 1 флакон (50 мл);

• концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» – 1 флакон (14 мл);

• раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 флакон (14 мл);

• стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);

• прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), 2 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Коэффициент вариации результатов определения коэффициента нейтрализации HBsAg в одном и том же образце с использованием набора «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» не превышает 8%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

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

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре 37°С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в пробирку, содержащую антикоагулянт. После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или мутную сыворотку и плазму, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре +2…8°С не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20°С или ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакеты с чистыми стрипами и со стрипами с антителами к HBsAg необходимо выдержать при комнатной температуре (+18…25°С) не менее 30 минут. Вскрыть пакеты и переставить на две свободные рамки необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие контрольные пробы готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизованных контрольных проб перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с контролем внести по 1 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 5 минут при комнатной температуре (+18…25°С) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В

Информация получена с официального сайта федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 0,66 мл.

7.1.4. Нейтрализующий буфер готов к использованию. Расход нейтрализующего буфера на один стрип составляет 0,415 мл.

7.1.5. Контрольный буфер готов к использованию. Расход контрольного буфера на один стрип составляет 0,415 мл.

7.1.6. Промывочный буфер. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.7. Буфер А готов к использованию. Расход Буфера А на один стрип составляет 0,5 мл.

7.1.8. Буфер Д готов к использованию.

7.1.9. Раствор ТМБ готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.10. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.11. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры.

В приложении 1 приведена схема проведения анализа.

7.1.12. Предварительное разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если концентрация HBsAg в исследуемых образцах по предварительным данным выше 5 МЕ/мл, образцы следует развести буфером Д в 100 и 1000 раз.

Пример:

Образец № 1 (разведение в 100 раз):

990 мкл буфера Д + 10 мкл исследуемого образца.

Образец № 2 (разведение в 1000 раз):

270 мкл буфера Д + 30 мкл образца № 1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок

ВНИМАНИЕ! <u>схема маркировки и нанесения образцов отличается от стандартной схемы.</u>

Лунки промаркировать следующим образом:

Нечётные стрипы для контрольного буфера;

Чётные стрипы для нейтрализующего буфера;

А1, А2 – № 1-2 – для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

В1 – №3 – для измерения величины оптической плотности отрицательной контрольной пробы с контрольным буфером;

В2 – №4 – для измерения величины оптической плотности отрицательной контрольной пробы с нейтрализующим буфером;

С1 – №5 – для измерения величины оптической плотности слабоположительной контрольной пробой с контрольным буфером;

С2 – №6 – для измерения величины оптической плотности слабоположительной контрольной пробы с нейтрализующим буфером;

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

D1 – №7 – для измерения величины оптической плотности положительной контрольной пробы с контрольным буфером;

D2 – №8 – для измерения величины оптической плотности положительной контрольной пробы с нейтрализующим буфером.

7.2.2. <u>Внесение реагентов в чистые стрипы</u>

7.2.2.1. Во все нечетные стрипы, кроме лунки №1, внести по 25 мкл контрольного буфера.

7.2.2.2. Во все четные стрипы, кроме лунки №2, внести по 25 мкл нейтрализующего буфера.

7.2.2.3. В соответствующие лунки внести по 100 мкл контрольных проб и исследуемых образцов в соседние чётные и нечётные лунки.

Примечание: *общее время внесения контрольных проб и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

7.2.2.4. Инкубировать стрипы при комнатной температуре без шейкирования в течение 30 минут.

7.2.3. <u>Внесение реагентов в стрипы с антителами к HBsAg</u>

7.2.3.1. Во все лунки, кроме А1 и А2, внести по 25 мкл Буфера А.

7.2.4. Из чистых стрипов перенести по 100 мкл содержимого лунок восьмиканальной пипеткой в той же последовательности в стрипы с Буфером А. Оставшееся содержимое «чистых» стрипов удалить в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода).

7.2.5. Инкубировать стрипы с антителами к HBsAg в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°С со скоростью 600-800 об/мин.

7.2.6. **Не удаляя содержимого лунок,** во все лунки, кроме А1 и А2, немедленно внести по 50 мкл конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза.

7.2.7. Инкубировать в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°С со скоростью 600-800 об/мин.

7.2.8. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.1.6, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5-10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.9. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ.

7.2.10. **<u>Инкубировать стрипы в темноте в термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью 600-800 об/мин при температуре +37°С в течение 10 минут.</u>**

7.2.11. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1-2 минут.

7.2.12. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.11., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение не более 20 минут при температуре 18...25°С.

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** среднюю величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: *Среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ед.ОП.*

8.2. Критерии достоверности анализа

Результаты анализа считают достоверными при соблюдении следующих условий:

- коэффициент нейтрализации для отрицательной контрольной пробы должен превышать 50%;
- коэффициент нейтрализации для положительной контрольной пробы не должен превышать 50%.

В случае если полученные данные выходят за пределы указанных значений, результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Расчет коэффициента нейтрализации

9.1.1. Умножить ОП СПК в лунке с контрольным буфером на **0,6**. Оценить ОП анализируемых образцов в лунке с контрольным буфером. Если ОП анализируемого образца меньше значения (ОП СПКх0,6), то коэффициент нейтрализации для него не рассчитывать.

9.1.2. Рассчитать коэффициент нейтрализации (КН), %

$$КН = (ОП_{н.б.}/ОП_{к.б.})*100, \quad (1)$$

где $ОП_{н.б.}$ – оптическая плотность в лунке с нейтрализующим буфером, ед.опт.пл.;

$ОП_{к.б.}$ – оптическая плотность в лунке с контрольным буфером, ед.опт.пл.

Округлить полученный результат до целого значения.

9.2. Интерпретация результатов

Таблица 1

ОП образца в лунке с контрольным буфером	Коэффициент нейтрализации образца	Интерпретация результатов
≥ ОП ПКП-к	> 50%	Развести образец Буфером Д и повторить анализ
≥ ОП ПКП-к	≤ 50%	Наличие HBsAg подтверждено
< ОП ПКП-к, но ≥ ОП СКП х 0,6	≤ 50%	Наличие HBsAg подтверждено
< ОП ПКП-к, но ≥ ОП СКП х 0,6	> 50%	HBsAg отсутствует
< ОП СКП х 0,6	-	HBsAg отсутствует

Примечание:

ОП ПКП-к – оптическая плотность ПКП в лунках с контрольным буфером;

ОП СКП-к – оптическая плотность СКП в лунках с контрольным буфером.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 5 суток.

Срок годности набора – 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы чистые поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре +2...8°С в течение всего срока годности;
- стрипы с антителами к HBsAg поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре +2...8°С в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, контрольные пробы после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизованных препаратов контрольные пробы хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- нейтрализующий буфер, контрольный буфер, буфер Д, конъюгат Е, буфер А и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18…25°С) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2..8°С в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4 эксперимента), ограничено объемом контрольных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо определять оптические плотности контрольных проб и ТМБ;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать промывочный буфер, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам качества набора «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, пос Песочный, ул. Ленинградская, д. 70, тел/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био» Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био» Сусорова А.С.

СОГЛАСОВАНО:
Главный врач
ГКДЦ (Вирусологический) Вашукова С.С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Информация получена с официального сайта федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru