

Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп. 3
Факс (37517) 263-62-57

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАКТИВОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

**ИФА-ГЕП-В
Набор Т12-стрип**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
здравоохранения
Республики Беларусь
А.С.Романенков
"14" 04 2004 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор предназначен для анализа сыворотки и плазмы крови на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) методом иммуноферментного анализа.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- Концентрат раствора для промывания планшета (концентрат раствора №1)	3 фл. по 25 мл
- Иммуносорбент	2 планшета
- Конъюгат иммуноферментный	1 амп.; 1,35 мл
- Раствор для разведения конъюгата (раствор №4)	1 фл., 15 мл
- Раствор для приготовления проявителя (раствор №5Т)	1 фл., 14 мл
- Хромоген ТМБ	1 фл., 14 мл
- Положительная контрольная сыворотка (K ⁺)	2 амп.; 1,5 мл
- Отрицательная контрольная сыворотка (K ⁻)	3 амп. по 1,7 мл
- Стоп-реагент (0,5 моль/л H ₂ SO ₄)	1 фл., 25 мл

2.2 Основные компоненты набора "ИФА-ГЕП-В" – иммуносорбент и иммуноферментный конъюгат.

Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, лунки которого сенсibilизированы моноклональными антителами к HBsAg.

Иммуноферментный конъюгат представляет собой моноклональные антитела к HBsAg, конъюгированные с пероксидазой хрена.

При внесении в лунки планшета образцов сывороток инфицированной крови HBsAg связывается со специфическими антителами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Образованные комплексы выявляют при помощи специфичного к HBsAg иммуноферментного конъюгата. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки планшета добавляют раствор субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ).

Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,5 М раствор серной кислоты), и интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм.

Величина ОП прямо пропорциональна концентрации HBsAg в образце сыворотки или плазмы. Чем выше содержание HBsAg в образце сыворотки, тем выше интенсивность окрашивания.

2.3 Набор рассчитан на проведение 192 анализов (включая контроли).

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 Присутствие в наборе "ИФА-ГЕП-В" некоторых биологических компонентов, источником которых является человек (положительная и отрицательная сыворотки), химикатов, а также работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе

анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты (согласно приказов МЗ РБ № 66 и №351);
- не пипетировать растворы ртом;
- все жидкие отходы необходимо обрабатывать раствором с массовой долей перекиси водорода 6% при комнатной температуре в течение 3 ч;
- все твердые отходы необходимо собирать в специальный контейнер и затем автоклавировать в течение 1 ч при температуре 120 °С;
- инструменты и оборудование, а также рабочие поверхности, на которых проводился анализ, необходимо до и после работы протирать в течение нескольких секунд раствором с объемной долей этилового спирта 70° либо другими синтетическими средствами вируцидного действия.

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток (плазмы), содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток или плазмы хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже -20 °С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

Необходимо помнить, что образцы с азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания не пригодны для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

**5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ,
НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

5.1 Фотометр для измерения оптической плотности;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,100 до 1,000 мл (от 100 до 1000 мкл);
- пипетки 8-ми каналные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл (от 50 до 300 мкл);
- суховоздушный термостат на 37 °С;
- мерные цилиндры вместимостью 20 и 1000 мл;
- стакан мерный вместимостью 1000 мл;
- ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
- клейкая пленка или крышка;
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор с объемной долей этилового спирта 70%;
- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

(из расчета на 16 лунок)

6.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при комнатной температуре (18-22) °С в течение 30 мин.

6.2 Приготовление раствора № 1 для промывания планшета.

Содержимое одного флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. Отобрать 6 мл

концентрата в мерный стакан или цилиндр, добавить в 180 мл дистиллированной воды и перемешать раствор.

Если концентрат раствора №1 содержит кристаллы, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (35-37) °С до полного растворения кристаллов.

Раствор № 1 для промывания планшета можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 сут.

6.3 Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении.

В чистый флакон отобрать 1 мл раствора № 4, внести 0,1 мл (100 мкл) конъюгата иммуноферментного. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит.

6.4 Приготовление раствора проявителя

В чистый флакон (с крышкой) отобрать 1 мл хромогена ТМБ, добавить 1 мл раствора № 5Т, смесь интенсивно перемешать в течение (30-40) с.

ВНИМАНИЕ! Раствор проявителя готовят непосредственно перед использованием в защищенном от света месте! Раствор хранению не подлежит!

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с раствором ТМБ, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники.

7 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

7.1 Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический или полуавтоматический промыватель – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них; лунки должны заполняться до краев (0,2-0,3 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;
- необходимо выдерживать лунки заполненными раствором для отмывания планшетов не менее 30 с;
- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Перед началом работы освободить необходимое количество стрипов от упаковочного пакета, вставить их в рамку. Стрипы, которые не используются в данной постановке, можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2-8) °С в течение одного месяца.

8.2 В лунки А-1, В-1 внести по 0,1 мл (100 мкл) (К⁺). В лунки С-1, D-1, E-1 внести по 0,1 мл (100 мкл) (К⁻). В остальные лунки стрипов внести по 0,1 мл (100 мкл) исследуемых образцов.

8.3 Выдержать стрипы при (18-22) °С в течение 10 мин. Во все лунки стрипов поверх контролей и образцов внести по 0,05 мл (50 мкл) раствора конъюгата в рабочем разведении (п. 6.3.).

Стрипы установить на автоматический встряхиватель, и перемешать содержимое лунок (при малой амплитуде встряхивания) в течение (15-20) с.

Стрипы заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 2 ч.

8.4 Удалить раствор сывороток и конъюгата из лунок стрипов с помощью промывателя или 8-канальной пипетки, затем стрипы 6 раз промыть раствором № 1 для промывания планшетов с экспозицией раствора в лунках стрипов в течение (40-60) с для каждого цикла промывания, удалить влагу, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

8.5 В каждую лунку стрипов внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора проявителя (п.6.4.).

Стрипы заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при температуре (18-22) °С в темном месте в течение 30 мин.

8.6 Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента. Не позже чем через 1 мин после остановки цветной реакции определить оптическую плотность (ОП) в лунках в двухволновом режиме при длине волны 450 нм относительно 620 нм;

Возможно измерение ОП в одноволновом режиме: при длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень (бланк) осуществляют по воздуху.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1 Рассчитать среднее значение ОП для лунок с (К⁻) - ОП_{ср} (К⁻) и для лунок с (К⁺) - ОП_{ср} (К⁺).

9.2 Результаты учитывают только при соблюдении следующих условий:

- ОП_{ср} (К⁻) не должно превышать 0,1 ОЕ;
- ОП_{ср} (К⁺) должно быть не ниже 0,6 ОЕ.

Если ОП_{ср} (К⁻) больше 0,010 ОЕ, то все значения ОП (К⁻) должны не более чем в два раза превышать ОП_{ср} (К⁻). В случае, если одно из значений ОП (К⁻) более чем в два раза превышает ОП_{ср} (К⁻), его отбрасывают и ОП_{ср} (К⁻) рассчитывают по оставшимся значениям ОП (К⁻).

Если ОП_{ср} (К⁻) меньше или равно 0,010 ОЕ, то все значения ОП (К⁻) должны находиться в интервале от -0,010 до +0,010 от ОП_{ср} (К⁻). В случае, если одно из значений ОП (К⁻) не соответствует этому условию, его отбрасывают и ОП_{ср} (К⁻) рассчитывают по оставшимся значениям ОП (К⁻).

9.3 При соблюдении выше перечисленных условий вычислить граничное значение ОП (ГЗ) по формуле (1):

$$ГЗ = ОП_{ср} (К^-) + 0,06 \quad (1).$$

9.4 Образец считается положительным, если значение ОП данного образца выше ГЗ.

Образец считается отрицательным, если значение ОП данного образца меньше ГЗ.

9.5 Образцы, давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать повторно не менее, чем в двух лунках набора: образцы положительные в одной и более лунках, следует считать положительными; образцы отрицательные в двух и более лунках, следует считать отрицательными.

9.6 Все образцы, которые при повторном анализе проявили себя как положительные, должны быть проверены подтверждающими методами.

10 ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА

10.1 Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

набор Т2-монолит – монолитный планшет, хромоген – раствор ТМБ. Набор рассчитан на проведение 2 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);

набор Т12-стрип – стриповый планшет, хромоген – раствор ТМБ. Набор рассчитан на проведение 12 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок).

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

11.1 Хранение набора должно производиться в чистом, сухом и темном помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Замораживать набор запрещается.

11.2 Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимости результатов пипетирования.

11.3 Для получения надежных результатов необходимо строго соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

11.4 Срок годности набора – 1 год.