



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. Академика Купревича В. Ф., 5, корп. 3
Факс (10 375 17) 263-62-57

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

ИФА-ГЕП-В

Набор Т12-стрип

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
27.01.2009 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор предназначен для проверки сыворотки или плазмы крови человека 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 (КРП)	3фл. по 25 мл
- Иммуносорбент	2 планшета
- Раствор для разведения конъюгата (РПК)	1 фл., 15 мл
- Субстратный буферный раствор (СБР)	1 фл., 14 мл
- Конъюгат	1 мкл.; 1,35 мл
- Хромоген ТМБ (ТМБ)	1 фл., 14 мл
- Положительная контрольная сыворотка (К ⁺)	2 мкл.; 1,5 мл
- Отрицательная контрольная сыворотка (К ⁻)	3 мкл.; 1,7 мл
- Стоп-реагент	1 фл., 25 мл

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

Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, в лунках которого сорбированы моноклональные антитела к HBsAg.

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

При внесении в лунки планшета образцов сывороток инфицированной крови и конъюгата, HBsAg, в случае его наличия связывается как со специфическими антителами на твердой фазе, так и с антителами конъюгата, образуя комплексы антиген-антитело.

Цветную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (1М 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.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями Приказов МЗ РБ № 66 и № 351. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями ОСТ 42-21-2-85.

3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.5 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

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 минус 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 0,05 мл до 5,000 мл (от 50 до 5000) мкл;
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 мл до 0,3 мл (от 50 до 300) мкл;
- суховоздушный термостат настроенный на температуру 42 °С;
- мерные цилиндры вместимостью 20 и 1000 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 1000 мл;
- ванночки для реагентов;
- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
- клейкая пленка или крышка;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые хирургические;
- 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 температуре (18-22) °С 30 минут.

6.2 Приготовление промывочного раствора
Если КРП содержит осадок в виде кристаллов, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (35-37) °С до полного растворения кристаллов.

Содержимое одного флакона с КРП интенсивно встряхнуть в течение (20-30) сек. Отобрать 6 мл концентрата в стеклянный стакан вместимостью 1000 мл, добавить 180 мл дистиллированной воды и перемешать раствор.

Промывочный раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 10 суток.

6.3. Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении
В чистый флакон отобрать 1 мл РПК, добавить 0,1 мл (100 мкл) конъюгата и тщательно перемешать, не допуская образования пены.

ВНИМАНИЕ! Раствор готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит.

6.4 Приготовление раствора проявителя
В чистый флакон внести 1 мл ТМБ, добавить 1 мл СБР и интенсивно перемешать смесь.

ВНИМАНИЕ! Раствор проявителя готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит!

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным.

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 (0,3 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- выдержать лунки с промывочным раствором в течение 30 сек;

- удалить раствор из лунок.

По окончании промывания планшета удалить остатки влаги, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

Некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Перед началом работы освободить от упаковки необходимое количество стрипов, 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) (K⁺). В лунки С-1, D-1, Е-1 внести по 0,1 мл (100 мкл) (K⁻). В остальные лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) исследуемых образцов.

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

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

8.5 Стрипы заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре 42 °С **2 часа**.

8.6 Удалить раствор сывороток и конъюгата из лунок стрипов с помощью промывателя или 8-канальной пипетки, затем стрипы **8 раз** промыть КРП с экспозицией раствора в лунках стрипов в течение (40-60) сек. для каждого цикла промывания, удалить влагу, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

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

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

8.9 Остановить пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента. Не позже чем через 5 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 (K⁻) - ОП_{ср} (K⁻) и для лунок с (K⁺) - ОП_{ср} (K⁺).

Результаты учитывают только при соблюдении следующих условий:

- ОП_{ср} (K⁻) не должно быть выше 0,1 ОЕ;

- ОП_{ср} (K⁺) должно быть не ниже 0,6 ОЕ.

Если одно из трех значений ОП(K⁻) больше 0,1 ОЕ его не учитывают и ОП_{ср}(K⁻) рассчитывают по оставшимся значениям ОП(K⁻).

9.2 Вычислить граничное значение ОП (ГЗ) по формуле (1):

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

9.3 Результаты анализа считаются положительными, если значение ОП данного образца больше ГЗ.

9.4 Результаты анализа считаются отрицательными, если значение ОП данного образца меньше ГЗ.

9.5 Образцы, давшие положительный 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 ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

11.1 Набор транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С.

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

Замораживать набор запрещается.

11.4. Срок годности набора – 12 месяцев.