



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 ПОДТВЕРЖДЕНИЯ НАЛИЧИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ИФА-П-ГЕП-В (стрип)

Набор Т6-стрип

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
27.01. 2009 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1. Набор предназначен для подтверждения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке и плазме крови человека после первичного скрининга методом иммуноферментного анализа.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- Концентрат раствора для промывания планшета (КРП)	2 фл. по 25 мл
- Иммуносорбент	2 планшета
- Раствор для разведения сывороток (РРС)	1 фл., 20 мл
- Раствор для разведения конъюгата (РРК)	1 фл., 15 мл
- Субстратный буферный раствор (СБР)	1 фл., 14 мл
- Конъюгат	1 мкпр., 1,35 мл
- Хромоген ТМБ (ТМБ)	1 фл., 14 мл
- Нейтрализующий компонент (НК)	1 мкпр., 0,35 мл
- Положительная контрольная сыворотка (К ⁺)	1 мкпр., 1,5 мл
- Отрицательная контрольная сыворотка (К ⁻)	2 мкпр., 1,5 мл
- Стоп-реагент	1 фл., 25 мл

2.2 Основные компоненты набора "ИФА-П-ГЕП-В (стрип)" – иммуносорбент, конъюгат и нейтрализационный компонент (НК).

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

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

НК - представляет собой моноклональные антитела к HBsAg.

При внесении в лунки планшета образцов сывороток и конъюгата присутствующий в образцах HBsAg связывается как со специфическими антителами на твердой фазе, так и с антителами конъюгата, образуя комплексы антиген-антитело. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки планшета добавляют раствор проявителя.

Цветную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,5М раствор серной кислоты), и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках при длине волны 450 нм, которая прямо пропорциональна концентрации HBsAg в образцах сыворотки или плазмы. Чем выше содержание HBsAg в образце сыворотки, тем выше интенсивность окрашивания.

Метод подтверждения результатов скринингового анализа на наличие HBsAg основан на принципе блокирования вируса гепатита В в образцах сывороток моноклональными антителами против HBsAg (нейтрализующим компонентом). При внесении в реакционную среду НК происходит ингибирование образования комплекса антиген-антитело за счет связывания антигенных детерминант HBsAg моноклональными антителами нейтрализующего компонента, что приводит к снижению ОП окрашенного раствора в лунках.

2.3 Набор рассчитан на проведение 96 анализов (включая контроли).

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 Присутствие в наборе "ИФА-П-ГЕП-В (стрип)" 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 0,100 до 1,000 мл (от 100 до 1000 мкл);
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл (от 50 до 300 мкл);
- суховоздушный термостат на 42 °С;
- мерные цилиндры вместимостью 20 и 1000 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 1000 мл;
- ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- 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 32 лунки)

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

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) с. Отобрать 8,0 мл концентрата в стакан вместимостью 1000 мл, добавить 240 мл дистиллированной воды и перемешать раствор.

Промывочный раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 сут.

6.3 Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении

В чистый флакон вместимостью 20 мл отобрать 2,0 мл РРК, добавить 0,2 мл (200 мкл) конъюгата. 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 конъюгата с НК

В чистый флакон вместимостью 20 мл отобрать 1,0 мл раствора конъюгата в рабочем разведении, приготовленного по п. 6.3., внести 0,05 мл (50 мкл) НК и тщательно перемешать, не допуская образования пены.

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата с НК готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит!

6.5 Приготовление раствора проявителя.

В чистый флакон вместимостью 20 мл внести 2,0 мл ТМБ, добавить 2,0 мл СБР и интенсивно перемешать смесь в течение (20-30) с.

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;
- выдерживать лунки с промывочным раствором в течение 30 с;
- 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 необходимое количество стриповых планшетов от упаковочного пакета, вставить их в рамку. Не использованные стриповые планшеты можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2-8) °С в течение одного месяца.

8.2 В лунки А-1, А-2 внести по 0,1 мл (100 мкл) (K⁺). В лунки В-1 и В-2 внести по 0,09 мл (90 мкл) РРС и по 0,01 мл (10 мкл) (K⁺) (разведение (K⁺) 1:10). В лунки С-1, С-2, D-1, D-2 внести по 0,1 мл (100 мкл) (K⁺). В остальные лунки стриповых планшетов внести исследуемые образцы сывороток – каждый образец в две лунки в соответствии с рисунком 1.

	1	2	3	4
A	(K ⁺)	(K ⁺)	№ 5	№ 5
B	(K ⁺) (1:10)	(K ⁺) (1:10)	№ 6	№ 6
C	(K ⁺)	(K ⁺)	№ 7	№ 7
D	(K ⁺)	(K ⁺)	№ 8	№ 8
E	№ 1	№ 1	№ 9	№ 9
F	№ 2	№ 2	№ 10	№ 10
G	№ 3	№ 3	№ 11	№ 11
H	№ 4	№ 4	№ 12	№ 12

Рисунок 1 – Схема внесения в лунки планшета исследуемых образцов сывороток

8.3 Выдержать стриповые планшеты при температуре (18-25) °С в течение **10 мин.**

8.4 В каждую лунку нечетных рядов стрипового планшета внести по 0,05 мл (50 мкл) раствора конъюгата в рабочем разведении, приготовленного по п. 6.3, а в лунки четных рядов внести по 0,05 мл (50 мкл) раствора конъюгата с НК, приготовленного по п. 6.4.

8.5 Рамку со стриповыми планшетами установить на автоматический встряхиватель, и перемешать содержимое лунок (при малой амплитуде встряхивания) в течение (15-20) с.

8.6 Стриповые планшеты заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре 42 °С в течение **2 ч.**

8.7 Удалить содержимое лунок с помощью промывателя или 8-канальной пипетки, затем лунки восемь раз промыть промывочным раствором с экспозицией раствора в лунках стрипового планшета в течение (40-60) с для каждого цикла промывания. Удалить остатки влаги, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.8 В каждую лунку стрипового планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора проявителя, приготовленного по п.6.5.

8.9 Стриповые планшеты заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при температуре (18-25) °С в темном месте в течение **30 мин.**

8.10 Остановить цветную реакцию внесением во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента. Не более 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.

ВНИМАНИЕ! Исследуемые образцы сывороток с высокой концентрацией HBsAg (ОП более 1,0 ОЕ) могут не нейтрализоваться НК. В таком случае эти образцы следует развести РРС в соотношении 1:10, 1:100 или более и повторить анализ.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1 Рассчитать среднее арифметическое значение ОП для лунок с (K⁺), обработанных раствором конъюгата без НК – ОП_{ср} (K⁺) (лунки С-1, D-1).

За значение ОП (K⁺) принимают значение ОП в лунке с не разведенным (K⁺), обработанным раствором конъюгата без НК (лунка А-1).

Значение ОП_{ср} (K⁺) не должно превышать 0,1 ОЕ;

Значение ОП (K⁺) должно быть не ниже 0,6 ОЕ

9.2 Рассчитать процент нейтрализации (X) для (K⁺), разведения (K⁺) 1:10 и исследуемых образцов сывороток по формуле (1):

$$X = \frac{D_0 - D}{D_0 - D_1} \times 100 \quad (1)$$

где D₀ – ОП в лунках с (K⁺) или исследуемыми образцами сывороток, обработанных раствором конъюгата без НК;

D – ОП в лунках с (K⁺) или соответствующими исследуемыми образцами сывороток, обработанных раствором конъюгата с НК;

D₁ – ОП_{ср} (K⁺).

Процент нейтрализации для (K⁺) должен составлять не менее 50 % при исследовании не разведенного или разведенного в соотношении 1:10 образца.

9.3 Вычислить граничное значение ОП (ГЗ) по формуле (2):

$$ГЗ = ОП_{ср} (K^+) + 0,06 \quad (2)$$

9.4 Результаты анализа считаются положительными, если значение ОП исследуемого образца, обработанного раствором конъюгата без НК, больше ГЗ и процент нейтрализации составляет не менее чем 50% хотя бы для одного из его разведений (в случае высокой концентрации HBsAg в исследуемом образце сыворотки).

9.5 Результаты анализа считаются отрицательными, если значение ОП исследуемого образца сыворотки, обработанного раствором конъюгата без НК, меньше ГЗ, и процент нейтрализации составляет менее 50% или

значение ОП больше ГЗ, но процент нейтрализации составляет менее 50 %.

Примеры:

1 D₀ = 1,584; D = 0,245; ОП_{ср} (K⁺) = 0,029;

ГЗ = 0,029 + 0,06 = 0,089

$$1,584 - 0,245$$

$$X = \frac{1,584 - 0,245}{1,584 - 0,029} \times 100 = 86\% \text{ - положительная сыворотка}$$

2 D₀ = 0,250; D = 0,180; ОП_{ср} (K⁺) = 0,029;

ГЗ = 0,029 + 0,06 = 0,089

$$0,250 - 0,180$$

$$X = \frac{0,250 - 0,180}{0,250 - 0,029} \times 100 = 31\% \text{ - отрицательная сыворотка}$$

Внимание: В связи с тем, что в исследуемых образцах могут быть иммунные комплексы, которые в не разведенной сыворотке блокируют сайты связывания антигена, значение ОП разведенной сыворотки по отношению к не разведенной могут увеличиваться (феномен Дениша).

10 ФОРМА ВЫПУСКА НАБОРА

10.1 Набор выпускается в следующем варианте комплектации:

- набор Т6 стрип – стриповый планшет, хромоген – раствор ТМБ. Набор рассчитан на проведение шести постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 2 стрипа (32 лунки).

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.

11.3 Срок годности набора – 12 месяцев.