

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления HBs-антигена с
использованием рекомбинантного
антигена и моноклональных
антител

«Гепаскан HBsAg» (комплект В)

ФСР 2008/03732

Гепаскан HBsAg

Е-0355

КОМПЛЕКТ В

Настоящая инструкция распространяется на комплект В набора реагентов «Гепаскан HBsAg» для выявления HBs-антигена с использованием рекомбинантного антигена и моноклональных антител, включающий следующие компоненты:

иммуносорбент - моноклональные антитела мыши к HBs-антигену, иммобилизованные в лунках разборного полистиролового или полихлорвинилового планшета для иммунологических реакций;

положительный контрольный образец K^+ - сыворотка крови человека, инактивированная, с добавленным рекомбинантным HBs-антигеном; не содержащая плазменного HBsAg, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1;

отрицательный контрольный образец K^- - сыворотка крови человека, инактивированная, не содержащая HBs-антигена, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1;

K^+ и K^- - прозрачные или опалесцирующие жидкости желтоватого цвета;

слабоположительный контрольный образец K^+_c - сыворотка крови человека, инактивированная, оттитрованная по ОСО 42-28-311-00-06П ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора, не содержащая HBs-антигена, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1;

аморфный порошок или таблетка белого цвета с желтоватым оттенком, гигроскопична;

конъюгат - моноклональные антитела мыши к HBs-антигену, меченные пероксидазой хрена: прозрачная жидкость красного цвета;

концентрат (25x) раствора № 1 для промывки планшетов (концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином): прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость; при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре от 35 до 37°C в течение 30 мин;

раствор для разведения конъюгата: прозрачная бесцветная пенящаяся жидкость; при хранении возможно выпадение осадка, растворяющегося при температуре от 35 до 37°C в течение 30 мин;

хромоген ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин): прозрачная бесцветная жидкость;

субстратная буферная смесь с гидроперитом для разведения хромогена (БСГ): прозрачная бесцветная жидкость;

стоп-реагент: прозрачная бесцветная жидкость.

Комплект В набора «Гепаскан HBsAg» выпускается в виде комплекта реагентов, упакованных в коробку. Комплект В набора рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные. Возможно проведение до 12 отдельных постановок (по количеству стрипов иммуносорбента) в зависимости от количества испытуемых образцов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект В набора реагентов «Гепаскан HBsAg» предназначен для выявления HBs-антигена в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа.

Чувствительность определения HBs-антигена составляет 0,1 МЕ/мл.

2. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Исследования образцов в данном наборе реагентов проводятся одностадийным иммуноферментным «сэндвич» - методом.

Для проведения анализа используются образцы сыворотки или плазмы крови человека в объеме не менее 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! Помните, что исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, может привести к получению ложных результатов.

В предлагаемом наборе реагентов не могут быть исследованы образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

Для исключения некорректных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Следует осветлять образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием.

Собранные образцы сывороток или плазмы хранят при температуре от 4 до 6°C. Если образцы не могут быть протестированы в течение 72 ч, их следует хранить при температуре не выше минус 15°C. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий.

Анализ проб следует проводить так, чтобы на каждого оператора одновременно приходилось не более двух планшетов.

Каждый образец сыворотки или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

Со всеми тестируемыми образцами, отработанными растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, следует обращаться как с инфицированными объектами:

- все отработанные растворы обезвреживать 4 % раствором хлорамина или 6 %-м раствором перекиси водорода при комнатной температуре в течение 3 ч;
- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и подвергать автоклавированию;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70% спиртом.

Для анализа дополнительно требуются следующие материалы и оборудование:

- дистиллированная или деионизованная вода;
- хлорамин или перекись водорода для обеззараживания;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;

- пипетки одноканальные автоматические вместимостью от 25 мкл до 1000 мкл;
- пипетки 8(12)-канальные вместимостью от 25 мкл до 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые вместимостью 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые вместимостью 1000 мкл;
- центрифуга настольная на $(3-10) \times 10^3$ об/мин;
- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью (1,5-2,2) мл для хранения и осветления образцов сыворотки;
- мерные стаканы или цилиндры вместимостью 250 мл и 500 мл;
- воздушный термостат на 37 °С;
- аппарат для промывания планшетов;
- встряхиватель для планшетов;
- спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при двух длинах волн 450 нм и 620-680 нм или при длине волны 450 нм;
- контейнер для сброса твердых отходов;
- автоклав для инактивации отходов;
- контейнер для слива отработанных жидкостей;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага.

3. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед началом работы компоненты набора выдержите при комнатной температуре в течение 30-35 мин (все реагенты, которые будут использованы для текущего анализа, должны иметь комнатную температуру!)

Испытуемые образцы сывороток или плазмы крови осветлите центрифугированием.

Условия и сроки хранения компонентов набора после вскрытия индивидуальной упаковки приведены в Таблице № 1.

Таблица 1. Условия и сроки хранения компонентов.

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	(2-8) °С в плотно закрытом пакете	8 недель
K ⁺	(2-8) °С	8 недель
K ⁻	(2-8) °С	8 недель
Конъюгат	(2-8) °С	8 недель
Концентрат раствора № 1	(2-8) °С	8 недель
Р-р для разведения конъюгата	(2-8) °С	8 недель
Хромоген ТМБ	(2-8) °С	8 недель
БСГ	(2-8) °С	8 недель
Стоп-реагент	(2-8) °С	До окончания срока годности набора

3.1. Раствор № 1 для промывки планшетов

Содержимое флакона с концентратом 25× раствора № 1 интенсивно встряхните. При выпадении в концентрате кристаллов прогрейте при температуре 37 °С до полного растворения.

В соответствии с количеством используемых стрипов отберите необходимое количество концентрата раствора № 1 (см. Таблицу № 2) и разведите дистиллированной водой до указанного в таблице № 2 объема.

Храните не более 48 ч при температуре от 4 до 25 °С.

Таблица № 2. Объемы реагентов, используемые при различном количестве образцов.

Кол-во стрипов	Раствор для промывки планшетов		Рабочее разведение конъюгата		Раствор субстрата	
	Концентрат (25×) раствора №1, мл	Дистиллированная вода, мл	Конъюгат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	Хромоген, мл	БСГ, мл
1	1	до 25	0,2	0,2	0,1	1
2	2	до 50	0,3	0,3	0,2	2
3	3	до 75	0,5	0,5	0,3	3
4	4	до 100	0,5	0,5	0,4	4
5	5	до 125	1,0	1,0	0,5	5
6	6	до 150	1,0	1,0	0,6	6
7	7	до 175	1,0	1,0	0,7	7
8	8	до 200	1,0	1,0	0,8	8
9	9	до 225	1,0	1,0	0,9	9
10	10	до 250	1,5	1,5	1,0	10
11	11	до 275	1,5	1,5	1,1	11
12	12	до 300	1,5	1,5	1,2	12

3.2. Рабочее разведение конъюгата

В случае выпадения осадка флакон с раствором для разведения конъюгата выдержите при температуре от 35 до 37°С в течение 30 мин до полного растворения осадка, интенсивно встряхните.

Непосредственно перед проведением анализа приготовьте рабочее разведение конъюгата, смешав конъюгат и раствор для разведения конъюгата в объемах, указанных в Таблице № 2. Тщательно перемешайте.

Храните не более 2 ч при комнатной температуре.

3.3. Рабочее разведение хромогена

За 5-10 мин до окончания иммунологической реакции приготовьте рабочее разведение хромогена, смешав хромоген и БСГ в объемах, указанных в Таблице № 2.

Храните не более 20 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором хромогена, использовать однократно, так как даже следы синтетических моющих средств приводят к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе пероксидазной реакции.

Не следует использовать фольгу для прикрывания флаконов с раствором хромогена из-за нежелательности контакта раствора хромогена с металлом.

3.4. Контрольный образец $K^+_{с}$

Непосредственно перед использованием во флакон с $K^+_{с}$ добавьте 0,7 мл дистиллированной воды, осторожно перемешайте и выдержите 5-10 мин при комнатной температуре.

Храните не более 4 ч при комнатной температуре.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Выньте иммуносорбент из упаковки и оставьте в каретке планшета необходимое количество стрипов. Остальные стрипы поместите обратно в пакет и храните в соответствии с условиями, указанными в таблице № 1.

4.1. Порядок внесения исследуемых и контрольных образцов сывороток

В три лунки внесите по 100 мкл K^- (при постановке анализа на одном или двух стрипах K^- вносите в две лунки), в одну лунку внесите 100 мкл K^+ , в две лунки по 100 мкл $K^+_{с}$ (см. п.3.4), в остальные лунки внесите по 100 мкл исследуемых сывороток.

4.2. Во все лунки планшета внесите по 25 мкл рабочего разведения конъюгата. Содержимое лунок перемешайте осторожным постукиванием по краю рамки, не допуская смешивания содержимого разных лунок. Планшет заклейте пленкой (или закройте крышкой) и выдержите либо 2 ч при температуре $(42,0 \pm 0,5)^{\circ}C$, либо 2 ч с использованием встряхивателя (500 об/мин) при температуре $(37,0 \pm 0,5)^{\circ}C$. Для увеличения чувствительности определения HBs-антигена до **0,05 МЕ/мл** планшет рекомендуется выдерживать при температуре $(42,0 \pm 0,5)^{\circ}C$ с использованием встряхивателя (500 об/мин).

4.3. Промывание планшетов

ВНИМАНИЕ! Неполное промывание лунок планшетов может привести к получению ложных результатов.

Удалите жидкость из лунок с помощью промывателя. Промойте стрипы планшета 5-кратно раствором № 1, внося в лунки по 250 мкл промывающего раствора и выдерживая его в лунках не менее 20 секунд. После промывания тщательно удалите влагу из лунок планшета, постукивая им по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

4.4. Во все лунки планшета внесите по 100 мкл рабочего разведения хромогена (см. п. 3.3). Планшет поместите в защищенное от света место на 25 ± 2 мин при температуре от 18 до $25^{\circ}C$.

Не располагайте планшеты стопкой!

4.5. Остановите пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 100 мкл стоп-реагента и немедленно проведите учет результатов.

5. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение оптической плотности (ОП) проводите при двух длинах волн 450 нм и 620-680 нм. Допускается учет результатов при одной длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществляйте по воздуху.

Результаты измерения ОП для контрольных образцов должны соответствовать требованиям пунктов 5.1 - 5.3.

5.1. Значение ОП K^+ должно быть не меньше 0,60 оптических единиц (о.е.);

5.2. Должно быть не менее двух значений ОП K^- , удовлетворяющих условиям:

а) быть меньше 0,15 о.е.;

б) превышать не более чем в 1,5 раза наименьшее из значений ОП K^- .

5.3. Среднее значение ОП в лунках с K^+ должно превышать ОП_{КРИТ}, которое вычисляют по формуле:

$$ОП_{КРИТ} = ОП_{СР}(K^-) + 0,05,$$

где ОП_{СР}(K^-) - среднее арифметическое всех (двух или трех) значений ОП K^- , удовлетворяющих условиям п. 5.2.

Если хотя бы одно из требований пп. 5.1 - 5.3 не выполняется, всё исследование необходимо повторить, обращая особое внимание на тщательное промывание планшетов (п. 4.3).

Результат исследования образца считается положительным, если соответствующая ему ОП больше или равна ОП_{КРИТ}.

Результат исследования образца считается отрицательным, если соответствующая ему ОП меньше ОП_{КРИТ}.

6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отрицательный результат показывает, что тестируемый образец не содержит HBs-антигена или содержит HBs-антиген в количестве, находящемся ниже уровня чувствительности набора реагентов «Гепаскан HBsAg».

Образцы, которые при первоначальном тестировании дали положительный результат, следует протестировать повторно не менее, чем в двух лунках.

Образцы, которые при повторных тестированиях не выявляются как положительные, следует считать отрицательными.

Невоспроизводимый положительный результат может быть обусловлен следующими техническими проблемами:

а) внесение образцов загрязненными наконечниками;

б) перекрестной контаминацией образцов в процессе отмывки или раскапывания сывороток;

в) неполным удалением реакционной смеси или промывающего раствора со дна лунок;

г) контаминацией субстрата ионами металлов.

Если хотя бы один из двух повторных результатов окажется положительным, образец рассматривают как содержащий HBs-антиген.

Для подтверждения положительного результата анализа или выявления неспецифически реагирующих ложноположительных образцов необходимо воспользоваться комплектом «Подтверждающий тест» набора «Гепаскан HBsAg», работающим по принципу конкурентного иммуноферментного анализа.

7. ФОРМА ВЫПУСКА

Комплект В набора «Гепаскан HBsAg» выпускается в виде следующих реагентов, упакованных в коробку:

Компонент	Описание	Кол-во
Иммуносорбент	разборный или цельный планшет, в пакете	1 шт.
K ⁺	1,5 мл в пластиковой пробирке	1 шт.
K ⁻	1,5 мл в пластиковой пробирке	2 шт.
K ⁺ _c	от 0,5 до 1,5 мл во флаконе (лиофилизированный)	1 шт.
Конъюгат	2,5 мл в пластиковой пробирке	1 шт.
Концентрат раствора №1	25 мл во флаконе	1 шт.
Р-р для разведения конъюгата	2,5 мл в пластиковой пробирке	1 шт.
Хромоген ТМБ	1,5 мл в пластиковой пробирке	1 шт.
Р-р для разведения хромогена	14 мл во флаконе	1 шт.
Стоп-реагент	13 мл во флаконе	1 шт.

8. СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Срок годности набора 12 месяцев. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Наборы хранят согласно СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2°C до 8°C. Замораживание не допускается.

Транспортировку осуществляют согласно СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2°C до 8°C. Замораживание не допускается! Допускается транспортировка в течение 3 суток при температуре от 9°C до 30°C.