

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для подтверждения содержания HBs-антигена с использованием рекомбинантного антигена и моноклональных антител «Гепаскан HBsAg» (комплект «Подтверждающий тест»)

ФСР 2008/03732

E-0383
Гепаскан HBsAg
подтверждающий тест

Настоящая инструкция распространяется на комплект «Подтверждающий тест» 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 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 ($K^+_{с}$) - сыворотка крови человека, инактивированная, оттитрованная по ОСО 42-28-311-00-06П ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора, не содержащая 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 °С в течение 30 мин;

раствор для разведения конъюгата:

прозрачная бесцветная пенящаяся жидкость; при хранении возможно выпадение осадка, растворяющегося при температуре от 35 до 37 °С 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;

нейтрализующие антитела - антитела козы к HBs-антигену в сыворотке крови человека: прозрачная или опалесцирующая жидкость желтоватого цвета;

контроль подтверждения - иммуноглобулин нормальный козий в сыворотке крови человека, инактивированной, не содержащей антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1: прозрачная или опалесцирующая жидкость желтоватого цвета;

стоп-реагент: прозрачная бесцветная жидкость.

Комплект «Подтверждающий тест» набора «Гепаскан HBsAg» выпускается в виде комплекта реагентов, упакованных в коробку. Комплект «Подтверждающий тест» набора рассчитан на проведение 48 анализов, включая контрольные.

Возможно проведение до 6 отдельных постановок в зависимости от количества испытуемых образцов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект «Подтверждающий тест» набора реагентов «Гепаскан HBsAg» предназначен для подтверждения наличия HBsAg в образцах сыворотки или плазмы крови человека, положительно реагирующих в комплектах А или В набора «Гепаскан HBsAg». Чувствительность определения HBs-антигена составляет 0,1 МЕ/мл.

2. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Исследования образцов в «Подтверждающем тесте» основано на взаимодействии HBsAg, присутствующего в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови, с нейтрализующими антителами. Нейтрализующие антитела выдерживаются с исследуемыми образцами, и если в образце содержится HBsAg, то он связывается с нейтрализующими антителами, что блокирует его взаимодействие с моноклональными антителами, иммобилизованными в лунках планшета.

Для проведения анализа используются образцы сыворотки или плазмы крови человека в объеме не менее 200 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 предлагаемой тест-системе 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 °С. Если образцы не могут быть протестированы в течение 72 ч, их следует хранить при температуре не выше минус 15 °С. 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 обрабатывать 4 %-м 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 %-м 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 для подачи жидкостей вместимостью от 25 до 1000 мкл;
- пипетки 8 (12)-канальные для подачи жидкости 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°C;
- 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	(2-8)°С	8 недель
Хромоген ТМБ	(2-8)°С	8 недель
БСГ	(2-8)°С	8 недель
Нейтрализующие антитела	(2-8)°С	8 недель
Контроль подтверждения	(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 48ч 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
2	2	до 50	0,3	0,3	0,2	2
4	4	до 100	0,5	0,5	0,4	4
6	6	до 150	1,0	1,0	0,6	6
8	8	до 200	1,0	1,0	0,8	8
10	10	до 250	1,5	1,5	1,0	10
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°C 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^+

Непосредственно перед использованием во флакон с K^+ добавьте 0,7мл дистиллированной воды для серии набора №24, 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

Для каждого исследуемого образца, K^+ и K^+ (за исключением K^-) используйте две параллельные лунки, обозначаемые в дальнейшем как КП-лунка («контроль подтверждения») и НА-лунка («нейтрализующие антитела»).

Внесите по 25 мкл контроля подтверждения в каждую лунку КП-лунку и по 25 мкл нейтрализующих антител в каждую НА-лунку.

Добавьте по 100 мкл каждого исследуемого образца в КП-лунку и затем в НА-лунку. Добавьте 100 мкл K^+ в одну КП-лунку и затем в одну НА-лунку. По 100 мкл K^+ добавьте в две КП-лунки, а затем - в две НА-лунки.

Примечание. Образцы, дающие при их исследовании комплектами А или В набора «Гепаскан HBsAg» оптическую плотность (ОП) больше 2,0 оптических единиц (о.е.), рекомендуется перед исследованием развести контролем подтверждения 1:10. Однако если ОП в КП-лунке в этом случае окажется меньше ОП_{КРИТ} (см. п. 3.3), анализ необходимо повторить, используя неразведенный образец.

В три свободные лунки внесите по 100 мкл K^- .

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 $(42,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, либо 2 ч с использованием встряхивателя (500 об/мин) при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Для увеличения чувствительности определения HBs-антигена до 0,05 МЕ/мл планшет рекомендуется выдерживать при температуре $(42,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ 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 с. 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.1.3). Планшет поместите в защищенное от света место на 25 ± 2 мин при температуре от 18 до 25°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 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 - 5.4.

5.1. Значение ОП K^+ в КП-лунке должно быть не меньше 0,60 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 КП-лунках с K^+ должно превышать $ОП_{\text{КРИТ}}$, которое вычисляют по формуле:

$$ОП_{\text{КРИТ}} = ОП_{\text{СР}}(K^-) + 0,05,$$

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

5.4. Подавление ОП для K^+ и K^+ , вычисляемое для каждой пары лунок (КП и НА) по формуле:

$$\frac{ОП(КП) - ОП(НА)}{ОП(КП) - ОП_{\text{СР}}(K^-)} \times 100\%,$$

должно быть не меньше 50 %.

В случае если хотя бы одно из условий пп. 5.1-5.4 не выполняется, все исследование необходимо повторить, обращая особое внимание на тщательное промывание планшетов (п. 4.3).

Образец считается положительным (содержащим HBsAg), если его ОП в КП-лунке не меньше ОП_{КРИТ} и подавление $\geq 50\%$.

Если ОП в КП-лунке образца не меньше ОП_{КРИТ}, а подавление $< 50\%$, исследование образца необходимо повторить, разведя его в 10, 100 и 1000 раз контролем подтверждения. Если хотя бы в одном из разведений образца его ОП в КП-лунке не меньше ОП_{КРИТ} и подавление $\geq 50\%$, образец считается положительным.

В остальных случаях образец считается отрицательным, то есть не содержащим HBsAg или содержащим его в концентрации ниже уровня чувствительности набора «Гепаскан HBsAg».

Если для образца, который был положительным при исследовании комплектами А или В набора «Гепаскан HBsAg», ОП в КП-лунке окажется меньше ОП_{КРИТ}, то анализ такого образца необходимо повторить. Если и при повторном анализе ОП в КП-лунке будет меньше ОП_{КРИТ}, образец считается отрицательным.

6. ФОРМА ВЫПУСКА

Комплект «Подтверждающий тест» 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	2 шт.
K ⁻	2 мл в пластиковой пробирке	1 шт.
K ⁺ _с	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 разв. хромогена	14 мл во флаконе	1 шт.
Нейтрализующие антитела	1,5 мл в пластиковой пробирке	1 шт.
Контроль подтверждения	10 мл во флаконе	1 шт.
Стоп-реагент	13 мл во флаконе	1 шт.

7. СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора 12 месяцев.

Набор 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.

Транспортирование осуществляют по СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2°C до 8°C. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование в течение 3 суток при температуре от 9°C до 30°C.