

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ
СПЕЦИФИЧНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА
ГЕПАТИТА В (HBsAg) НА ОСНОВЕ МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ
ИНГИБИЦИИ (ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ ТЕСТ)
«HBsAg ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ-ИФА»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «HBsAg ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ-ИФА» предназначен для подтверждения выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. При клиническом лабораторном анализе различных форм вирусного гепатита В (ВГВ) определяют ряд серологических маркеров этой болезни: структурные антигены (HBs-антиген и HBe-антиген), а также специфические антитела классов IgM и IgG к HBc-антигену и антитела класса IgG к HBs- и HBe-антигенам.

HBsAg - основной маркер инфицирования ВГВ - является структурным белком, отвечающим за адсорбцию вируса на гепатоцитах. Это первый маркер, который проявляется в крови через 3-5 недель от момента инфицирования, до появления клинических симптомов, и при остром гепатите определяется еще в течение нескольких месяцев в достаточно высоких концентрациях. При благоприятном течении болезни HBsAg исчезает через 4-6 месяцев после заражения. Если этого не происходит, диагностируют хронический гепатит.

Среди лабораторных методов определения HBsAg наиболее распространенным и высокочувствительным является ИФА.

1.3. Область применения – клиническая лабораторная деятельность.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Выявление HBsAg в сыворотке (плазме) крови основано на конкурентном твердофазном иммуноферментном анализе. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы моноклональные антитела к HBsAg. При добавлении в лунки планшета исследуемого образца, образца с высоким содержанием антител к HBsAg, биотинилированных моноклональных антител к HBsAg, происходит ингибция связывания моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител с HBsAg в анализируемом образце. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски пропорциональна % ингибции HBsAg в исследуемом образце сыворотки (плазмы) крови.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Спектрофотометрическая верификация дозирования исследуемых образцов и реагентов.

Определение правильности внесения исследуемых образцов и контрольных сывороток. После внесения контрольных сывороток и исследуемых образцов в лунки планшета возможно верифицировать факт правильного дозирования и отсутствие ошибки внесения путем измерения оптической плотности (ОП) на длине волны 450 нм. Все лунки с внесенными образцами или контрольными сыворотками должны иметь значение ОП >0.07 (450 нм).

4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	CC009Z	aHBs +	«Anti-HbsAg плюс»: козы антигена к HBsAg, внесенные в сыворотку крови человека, не содержащую HBsAg и антигена к HBsAg, ВИЧ 1,2 и вирусу гепатита С, инактивированную прогреванием (0.6 мл)	1	шт	прозрачная жидкость красного цвета
2	CD009Z	aHBs -	«Anti-HbsAg минус»: козы антигена, не содержащие антиген к HBsAg, внесенные в сыворотку крови человека, не содержащую HBsAg и антигена к HBsAg, ВИЧ 1,2 и вирусу гепатита С, инактивированную прогреванием (0.6 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
3	K009CIR	-	Инструкция по применению Набора реагентов «HBsAg ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ-ИФА»	1	шт	-

Для удобства использования Набора дополнительно поставляется Буфер для разведения образцов (SP009C), 50 мл, прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Для использования в диагностике *ин vitro*.

5.3. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5.0% раствор серной кислоты), в испытуемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.4. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.5. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции. Положительные контрольные сыворотки CONTROL Ag+ CONTROL Ag++ и отрицательная контрольная сыворотка CONTROL- инактивированы прогревом при +56 °С в течение 2 часов и добавлением 2% детергента Tween20.

5.6. Все компоненты Набора реагентов «HBsAg Подтверждающий-ИФА» проверены на отсутствие антител к вирусу гепатита С и ВИЧ.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBsAg) В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «HBsAg-ИФА», K009, «ХЕМА»;
- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450–620 (680) нм;
- орбитальный термостабируемый шейкер (встряхиватель) для микропланшет, скорость 600–900 об/мин, поддерживающий температуру +37 °С ±3 °С или +42 °С ±3 °С;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода бидистиллированная (или деионизованная);
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

В случае, если для работы с Набором реагентов Вам понадобились дополнительные объемы вспомогательных компонентов {раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), концентрат отмывочного раствора, стоп-реагент}, бумага для заклеивания планшета, одноразовые наконечники для дозаторов, ванночки для реагентов, 96-луночные планшеты для подготовки исследуемых образцов, пробирки для пробоподготовки, просим Вас обратиться к представителю производителя в Вашем регионе или по телефону горячей линии технической поддержки: 8-800-505-23-45. Производитель гарантирует оперативную поставку указанных расходных материалов бесплатно и в необходимом для работы количестве.

В случае, если Вам требуется помощь в настройке лабораторного оборудования для работы с Набором реагентов (вошеры, термощейкеры, термостаты, спектрофотометры, ИФА-анализаторы и проч.), консультация или обучение сотрудников Вашей лаборатории, просим Вас обратиться к представителю производителя в Вашем регионе или по телефону горячей линии технической поддержки 8-800-505-23-45. Производитель гарантирует оперативный бесплатный выезд специалиста клиентского сервиса в Вашу лабораторию.

Набор реагентов адаптирован к любым открытым полу- и автоматическим ИФА-платформам (анализаторам), рекомендованным к использованию на территории РФ. Наши специалисты помогут Вам настроить и запустить анализ на базе Вашей лаборатории.

Для некоторых моделей анализаторов потребуются дополнительные объемы вспомогательных компонентов, адаптеры для флаконов, специализированная тара для компонентов Набора. Для этого просим Вас обратиться к представителю производителя в Вашем регионе или по телефону горячей линии технической поддержки 8-800-505-23-45. Производитель гарантирует оперативную поставку указанных расходных материалов бесплатно и в необходимом для работы количестве.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа реагенты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «HBsAg ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора. Срок годности 24 месяца. Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С ±3 °С не более 15 суток.

Не допускается замораживание целого Набора.

8.2. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

9. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

9.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается. Допускается исследование сывороток, хранение которых с момента забора крови осуществлялось при температуре от +2 °С до +8 °С не более 7 суток.

9.2. Сыворотку (плазму) крови с высоким содержанием HBsAg (более 3 ОЕ) следует предварительно развести буфером для разведения образцов SP009C в 10 и 100 раз.

9.3. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора реагентов «HBsAg ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ-ИФА».

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Проведение анализа согласно инструкции к набору K009 «HBsAg-ИФА» с изменениями:

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов из расчета: исследуемые образцы в двух повторах и 7 лунок для контрольных сывороток (3 лунки для CONTROL- и по две лунки каждого CONTROL+).
2	Внесите в соответствующие лунки по 100 мкл отрицательной контрольной сыворотки CONTROL-, положительной контрольной сыворотки CONTROL 1+ и положительной контрольной сыворотки CONTROL 2+. В остальные лунки внесите в дубликатах по 100 мкл разбавленных (если необходимо) исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение контрольных сывороток и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
3	Прямой ИФА: В одну из лунок с образцом и CONTROL 1+, CONTROL 2+ добавьте 10 мкл aHBs- Конкурентный ИФА: В другую лунку с образцом и CONTROL 1+, CONTROL 2+ добавьте 10 мкл aHBs+ Не добавляйте реагенты в лунки с CONTROL-.
4	Внесите во все лунки по 30 мкл конъюгата А.
5	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 40 мин при температуре +42 °С и постоянном встряхивании со скоростью 800-900 об/мин или 60 мин при температуре +37 °С и постоянном встряхивании со скоростью 800-900 об/мин. Обратите внимание на работу термощейкера – образцы не должны попадать на защитную пленку вследствие слишком интенсивного перемешивания, если это происходит уменьшите скорость перемешивания.
6	Внесите дополнительно по 30 мкл раствора конъюгата В. Конъюгат вносится в лунки БЕЗ промывки!
7	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и Инкубируйте его в течение 15 мин при температуре +42 °С и постоянном встряхивании со скоростью 800-900 об/мин или 20 мин при температуре +37 °С и постоянном встряхивании со скоростью 800-900 об/мин.
8	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки планшета 7 раз. При каждой отмывке добавьте во все лунки не менее 400 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), требуется задержка при отмывке (замачивание лунок), время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок. По окончании промывки остатки влаги удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
9	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при температуре +42 °С в течение 15 мин или при температуре +37 °С в течение 20 мин.
10	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
10	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм и референс светофильтре 620-680 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 40 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.

1	Рассчитайте среднюю ОП отрицательной контрольной сыворотки CONTROL-; $ОП (CN009Z)_{ср} = (ОП1(CN009Z) + ОП2 (CN009Z) + ОП3 (CN009Z))/3$
2	Результаты анализа считать достоверными, если - ОП положительного контроля CONTROL 1+ и aHBs- не ниже 0.2 оптических единиц (ОЕ) - ОП положительного контроля CONTROL 2+ и aHBs- не ниже 1.0 оптических единиц (ОЕ) - % нейтрализации CONTROL 1+, CONTROL 2+ и aHBs+ более 50% - ОП отрицательного контроля не выше 0.12 ОЕ Если одно из значений Отрицательного контроля выходит за пределы интервала, то его значение не участвует в расчете ОП(CN009Z)ср
3	Присутствие поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в исследуемых образцах и контрольных положительных образцах определяется показателем нейтрализации – это соотношение значений оптической плотности образца после нейтрализации и значений оптической плотности образца до нейтрализации. Показатель нейтрализации (%) определяется по формуле: $\frac{ОП_{образец\ прямой} - ОП_{образец\ конкурентный}}{ОП_{образец\ прямой} - ОП_{CONTROL-}} \times 100\%$ где: ОП образец прямой – оптическая плотность образца после внесения aHBs- (Прямой ИФА)-; ОП образец конкурентный – оптическая плотность образца после внесения aHBs+ (Конкурентный ИФА); ОП CONTROL- – среднее значение оптической плотности контрольного отрицательного образца CONTROL-.

12. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1	Рассчитайте уровень граничного значения Cut off для этого к среднему значению ОП отрицательной контрольной сыворотки CONTROL- прибавьте коэффициент А. Значение коэффициента А указано в аналитическом паспорте (Паспорте контроля качества). Образец сыворотки (плазмы) крови следует считать серопозитивным (положительным) если ОП образец прямой > Cut Off, показатель нейтрализации ≥50%. В этом случае присутствие в образце HBsAg следует считать доказанным и дальнейшая проверка не требуется.
2	Образец сыворотки (плазмы) крови следует повторно протестировать в дополнительном разведении, если ОП образец прямой > Cut Off и показатель нейтрализации <50%. Если разведенный образец имеет показатель нейтрализации ≥50% и ОП образец прямой > Cut Off, то его следует считать положительным. Если разведенный образец имеет показатель нейтрализации <50% и ОП образец прямой > Cut Off и ОП образец прямой < 3.0 ОЕ, то его следует считать отрицательным.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «**HBsAg ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ- ИФА**», следует обращаться к поставщику продукции ООО «ХЕМА» в Вашем регионе или по телефону горячей линии технической поддержки: 8-800-505-23-45

Инструкция по применению Набора реагентов «HBsAg-ИФА» составлена руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА», к. б. н. Д. С. Кострикиным