

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
HBs-антигена вируса гепатита В

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

HBsAg – ИФА – Бест
(комплект № 3)

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-0544

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «HBsAg-ИФА-Бест» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления HBs-антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке/плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа. Минимальная концентрация HBsAg, выявляемая с помощью данного набора, составляет по отраслевому стандартному образцу HBsAg (ОСО 42-28-311-06П) 0,01 МЕ/мл.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 91 неизвестного образца, 5 контрольных образцов, всего 96 определений при использовании всего планшета. При отдельном использовании каждый стрип рассчитан на проведение анализа 3 неизвестных образцов, 5 контрольных образцов, всего 8 определений.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации при добавлении в лунки планшета исследуемого образца и биотинилированных поликлональных антител к HBsAg происходит связывание моноклональных антител, иммобилизованных на внутренней поверхности лунок, и биотинилированных поликлональных антител с HBsAg в анализируемом образце. Во время второй инкубации стрептавидин, меченный пероксидазой, связывается с биотинилированными поликлональными

антителами к HBsAg, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Комплексы антиген-антитело выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. После добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–655 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- иммуносорбент – планшет разборный с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+ ; прозрачная или с легкой опалесценцией жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- слабopоложительный контрольный образец, инактивированный ($K^+_{\text{слаб}}$; концентрация HBsAg (0,05±0,02) МЕ/мл; прозрачная или с легкой опалесценцией жидкость желто-коричневого цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^- ; прозрачная или с легкой опалесценцией жидкость желтого цвета) – 1 фл., 2,5 мл;
- конъюгат №1, концентрат (биотинилированные поликлональные антитела к HBsAg, прозрачная жидкость синего цвета) – 1 фл., 1,0 мл;
- конъюгат №2, концентрат (стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена; прозрачная жидкость зеленого цвета) – 1 фл., 1,5 мл;

- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25; прозрачная бесцветная жидкость; допускается наличие осадка солей, исчезающего при нагревании до 30-40°C) – 2 фл. по 28 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 1 (РРК №1; прозрачная или с легкой опалесценцией жидкость голубого цвета) – 1 фл., 7,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 2 (РРК №2; прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 13,0 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР; прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 13,0 мл;
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 1,0 мл;
- стоп-реагент (прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 12,0 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 4 шт.;
- наконечники для пипетки – 32 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. Специфичность: 100% выявления HBsAg по результатам тестирования панели сывороток, не содержащих HBsAg (СОП-06-20).

4.2. Чувствительность (минимальная концентрация HBsAg, определяемая по ОСО 42-28-311-06П) – 0,01 МЕ/мл.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

5.2. Все компоненты набора являются нетоксичными.

Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. *В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.*

5.3. 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.).

5.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любой другой возбудитель вирусных и бактериальных инфекций.

5.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы.

5.6. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , дioxлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

5.8. Точность и воспроизводимость результатов анализа зависят от строгого выполнения следующих правил:

– не используйте реагенты с истекшим сроком годности;

– при постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест»;

– *запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей;*

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, кото-

рые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

- используйте стеклянную посуду, тщательно вымытую и ополоснутую дистиллированной водой, или (предпочтительно) одноразовую посуду;

- ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;

- избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

- рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

- никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

- никогда не используйте одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и рабочего раствора ТМБ; обращаем Ваше внимание на то, что малейшее, даже не видимое глазом загрязнение пипеток раствором конъюгата, может привести к контаминации всего содержимого флакона с СБР и ТМБ, поэтому необходимо протирать рабочую поверхность стола и конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом перед внесением ТМБ в СБР;

- проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы;
- не изменяйте протокол исследования;
- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

1. Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.

2. Используйте указанный в инструкции режим промывки.

3. Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

4. Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки.

5. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

6. Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

7. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

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

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм – 655 нм;
- холодильник бытовой;
- термостатируемый шейкер орбитального типа на 700–800 об/мин, поддерживающий температуру $(42\pm 1)^\circ\text{C}$ либо $(37\pm 1)^\circ\text{C}$;
- автоматический либо ручной промыватель для планшетов;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей до 350 мкл;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл, 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл, 2000 мл;
- вода дистиллированная.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

7.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови.

7.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Следует избегать многократного замораживания/оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

7.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

7.4. Для отбора исследуемых образцов и компонентов набора реагентов использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

8.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, при температуре от 18 до 25°C не менее 60 мин.

8.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

8.2.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

8.2.2. После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть заворачивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение всего срока годности набора.

8.3. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

8.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином в 25 раз.

Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30–40°C до полного растворения осадка.

Хранение: не более 5 суток при 2–8°C.

8.5. ПОДГОТОВКА КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

8.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА № 1

При приготовлении рабочего раствора конъюгата № 1 использовать пластиковую ванночку для реагентов и одноразовые наконечники для пипетки!

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в пластиковую ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество РРК № 1 и добавить соответствующее количество концентрата конъюгата № 1, тщательно перемешать.

Хранение: до 6 часов при 18–25°C.

8.7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА № 2

При приготовлении рабочего раствора конъюгата № 2 использовать пластиковую ванночку для реагентов и одноразовые наконечники для пипетки!

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в пластиковую ванночку для реагентов, входящую в состав набора, внести необходимое количество РРК № 2 и добавить соответствующее количество концентрата конъюгата № 2, тщательно перемешать.

Хранение: до 6 часов при 18–25°C.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата № 1		Рабочий раствор конъюгата № 2		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Промывочный раствор	
	Конъюгат № 1, концентрат, мкл	РРК №1, мл	Конъюгат № 2, концентрат, мкл	РРК №2, мл	ТМБ, концентрат, мл	СБР, мл	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистилл. вода, мл
1	50	0,5	100	1,0	0,05	1,0	3,0	до 75
2	100	1,0	200	2,0	0,10	2,0	6,0	до 150
3	150	1,5	300	3,0	0,15	3,0	9,0	до 225
4	200	2,0	400	4,0	0,20	4,0	12,0	до 300
5	250	2,5	500	5,0	0,25	5,0	15,0	до 375
6	300	3,0	600	6,0	0,30	6,0	18,0	до 450
7	350	3,5	700	7,0	0,35	7,0	21,0	до 525
8	400	4,0	800	8,0	0,40	8,0	24,0	до 600
9	450	4,5	900	9,0	0,45	9,0	27,0	до 675
10	500	5,0	1000	10,0	0,50	10,0	30,0	до 750
11	550	5,5	1100	11,0	0,55	11,0	33,0	до 825
12	600	6,0	1200	12,0	0,60	12,0	36,0	до 900

8.8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА

Внимание! Рекомендуется выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином. Посуду и наконечники для пипетки, контактирующие с раствором ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств,

поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество СБР, добавить соответствующее количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

Допустимо голубое окрашивание рабочего раствора ТМБ, которое не оказывает влияния на результаты анализа.

Хранение: не более 3 часов при 18–25°C в темноте.

Внимание! При приготовлении раствора следует использовать концентрат ТМБ, входящий в комплектацию данной серии набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Внести контрольные образцы:

- 1 лунка – 100 мкл K^+ ;
- 1 лунка – 100 мкл K^+ _{слаб.};
- 3 лунки – по 100 мкл K^- .

Например, в лунки А-1, В-1, С-1 внести по 100 мкл K^- ; в лунку D-1 – 100 мкл K^+ ; в лунку E-1 – 100 мкл K^+ _{слаб.}.

В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых образцов.

9.2. Внести во все лунки по 50 мкл рабочего раствора конъюгата № 1 (п. 8.6.) *не касаясь наконечниками стенок лунок!*

Для внесения рабочего раствора конъюгата №1 использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

9.3. Отрезать пленку требуемого размера. Закрыть лунки планшета, плотно прижав пленку. **Внимание!** Пленка предназначена для одноразового использования!

Инкубировать в термостатируемом шейкере: 40 мин при 42°C **или** 60 мин при 37°C с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

9.4. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 8.4.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения (остаточный объем не должен превышать 10 мкл).* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

Примечание: Промывку при помощи автоматического промывателя рекомендуется про-

водить в режиме с переполнением («Overflow») с 5-ю циклами промывки и внесением в лунки по 600–700 мкл рабочего промывочного раствора. При этом следует использовать поперечную аспирацию раствора из лунок (режим «Crosswise»).

9.5. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата № 2 (п. 8.7.).

Для внесения рабочего раствора конъюгата №2 использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

9.6. Отрезать пленку требуемого размера. Закрыть лунки планшета, плотно прижав пленку.

Инкубировать в термостатируемом шейкере: 30 мин при 42°C *или* 30 мин при 37°C с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

9.7. По окончании второй инкубации содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета с помощью автоматического или ручного промывателя 5 раз как описано в п. 9.4.

9.8. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (п. 8.8.) и инкубировать в темноте в течение 30 мин при температуре 18–25°C.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

9.9. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение на одной длине волны – 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

11. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

11.1. ТЕРМОШЕЙКЕР, 42°C

- Внести:** по 100 мкл K^+ , K^+ _{слаб.}, K^- , анализируемых образцов.
- Внести:** по 50 мкл рабочего раствора конъюгата №1.
- Инкубировать:** 40 мин, 700 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора конъюгата №2.
- Инкубировать:** 30 мин, 700 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.

- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 30 мин при 18–25°C в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

11.2. ТЕРМОШЕЙКЕР, 37°C

- Внести:** по 100 мкл K^+ , K^+ _{слаб.}, K^- , анализируемых образцов.
- Внести:** по 50 мкл рабочего раствора конъюгата №1.
- Инкубировать:** 60 мин, 700 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора конъюгата №2.
- Инкубировать:** 30 мин, 700 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 30 мин при 18–25°C в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

12. РАСЧЕТЫ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

12.1. РАСЧЕТЫ

12.1.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом – $ОП_{ср} K^-$.

12.1.2. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} K^- + 0,05$$

12.2. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

12.2.1. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом не должно превышать 0,15 ед. опт. плотн.

12.2.2. Значение $ОП K^-$ в каждой лунке должно находиться в пределах от $0,6 \times ОП_{ср} K^-$ до $1,4 \times ОП_{ср} K^-$. Значение $ОП K^-$, выходящее из этих пределов, следует исключить, а $ОП_{ср} K^-$ пересчитать.

12.2.3. Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 1,0 ед. опт. плотн.

12.2.4. Значение оптической плотности в лунке со слабоположительным контрольным образцом должно быть больше $ОП_{крит}$.

12.2.5. Результат анализа считают **положительным**, если $ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$.

Результат анализа считают **отрицательным** если $ОП_{обр} < ОП_{крит}$,

где $ОП_{обр}$ – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом сыворотки (плазмы) крови.

12.2.6. Положительный результат, полученный в постановке набора реагентов «HBsAg-ИФА-Бест», должен быть подтвержден в реакции нейтрализации с использованием набора «HBsAg-подтверждающий-ИФА-Бест» (номер по каталогу D-0546).

12.2.7. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации HBsAg в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

13.1. Набор реагентов «HBsAg-ИФА-Бест» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание набора не допускается.

13.2. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности.

13.3. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

ИЗУЧЕНИЕ КЛИНИКО–ЛАБОРАТОРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НАБОРА

Характеристики набора реагентов «HBsAg-ИФА-Бест» были получены при исследовании образцов крови

доноров, пациентов с острым и хроническим гепатитом В, коммерческих панелей сывороток крови, содержащих и не содержащих HBsAg, панели сывороток крови, содержащих HBsAg разных субтипов, коммерческих сероконверсионных панелей, контрольной панели мутантных вариантов HBsAg, отраслевого стандартного образца HBsAg ОСО 42-28-311-06-П и международного стандарта HBsAg.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Для оценки специфичности набора реагентов «HBsAg-ИФА-Бест» были проанализированы две группы сывороток крови доноров: первая – 3592 образцов, не содержащих HBsAg по данным исследования в СПК (при помощи других тест-систем); вторая – 2302 образца, забракovaných на СПК по наличию HBsAg, антител к вирусу гепатита С, ВИЧ-1, ВИЧ-2, антигенов ВИЧ, антител к *Tr. pallidum*, по наличию повышенного уровня АЛТ, АСТ, а также по внешним показателям (гемолизированные, гиперлипидемичные и т.д.).

В первой группе один из всех образцов показал в наборе реагентов «HBsAg-ИФА-Бест» положительный результат определения HBsAg со значением коэффициента позитивности (отношение величины ОП исследуемого образца к значению ОП_{крит.}), равным 1,6. Дальнейшее исследование данного образца сыворотки в реакции нейтрализации при помощи набора реагентов «HBsAg-подтверждающий-ИФА-Бест» подтвердило положительный результат. Кроме того, в этой сыворотке было определено наличие других серологических

маркеров инфекции: суммарных антител и иммуноглобулинов класса М к HBcoreAg. Был сделан вывод, что один из 3592 образцов сывороток крови доноров, охарактеризованных на СПК как «отрицательные», является «положительным», и кровь данного донора должна быть отбракована, как содержащая HBsAg (и другие маркеры гепатита В). Специфичность набора реагентов «HBsAg – ИФА – Бест» составила 100%.

Во второй группе выявлено 128 положительных образцов. Из них содержание HBsAg в 110 образцах было подтверждено в реакции нейтрализации с использованием набора реагентов «HBsAg-подтверждающий-ИФА-Бест»; 18 образцов были признаны ложнопозитивными. Специфичность набора реагентов «HBsAg-ИФА-Бест» при анализе данной категории сывороток составила 99,2%.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Чувствительность определения HBsAg, оценивалась в соответствии с приказом Минздрава РФ № 384 от 30.10.2000 г. по отраслевому стандартному образцу HBsAg ОСО 42-28-311-06-П, а также по II международному стандарту HBsAg, субтипа adw2, генотипа А (NIBSC – национальный институт биологических стандартов и контроля, Великобритания), и составила в обоих случаях 0,01 МЕ/мл.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для определения диагностической чувствительности проанализировано 397 образцов сывороток

крови больных острым и хроническим гепатитом В. Чувствительность набора составила 100 %.

Для оценки диагностической эффективности использования набора реагентов «HBsAg – ИФА – Бест» было проведено исследование данного набора в сравнении с другими коммерческими наборами ведущих фирм-производителей («Monolisa HBsAg ULTRA» («Bio-Rad», Франция), «Ensygnost HBsAg 5.0» («Dade Behring», Германия), «Abbott Murex HBsAg (V3)» («Abbott Murex», Великобритания) и Abbott AXSYM HBsAg(V2) («Abbott Diagnostics», США) – у которых чувствительность выявления HBsAg составляет 0,05–0,1 МЕ/мл.

Исследование референс-панели сывороток ОСО 42-28-64-02, содержащих и не содержащих HBsAg, производства медицинского центра «Авиценна» (Москва) и «ВВИ Diagnostics» (США), а также стандартной панели сывороток, содержащих HBsAg различных субтипов (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) показало, что коэффициенты позитивности положительных образцов панелей были значительно выше при анализе данных образцов при помощи набора «HBsAg – ИФА – Бест».

При тестировании образцов 7 коммерческих сероконверсионных панелей (всего 92 образца) в наборе реагентов «HBsAg – ИФА – Бест» было выявлено 60 положительных образцов из 92. По данным, приведенным в паспортах к панелям, количество образцов, положительных по HBsAg, определенных с помощью разных иммуноферментных наборов, варьирует в широких пределах: от 19 до 39 из всех 92 сывороток, а методом ПЦР выяв-

лено наличие ДНК ВГВ в 72 образцах. Набор реагентов «HBsAg – ИФА – Бест» позволяет выявлять HBsAg в более ранние сроки сероконверсии, чем другие иммуноферментные наборы. Первое выявление HBsAg происходит в 1–28 день от первого забора крови (среднее значение 18,6 дн.) в зависимости от рассматриваемой панели. Это сопоставимо с результатами первого обнаружения вирусной ДНК методом ПЦР с использованием набора «ROCHE HBV Ampliscreen» (1–21 день, среднее значение – 12,3 дня). Среднее значение первого выявления HBsAg другими ИФА-наборами составляет 33,6–45,9 дня.

Для исследования чувствительности набора реагентов «HBsAg – ИФА – Бест» в отношении мутантных форм HBsAg была использована «Контрольная панель мутантных вариантов HBsAg субтипов ауw1 и адw2» (ООО «НПО Диагностические системы», Нижний Новгород). Данная панель состоит из 13 рекомбинантных белков, структура которых соответствует HBsAg с наиболее значимыми мутациями. Каждый белок представлен в двух разведениях (всего 26 образцов). В наборе реагентов «HBsAg – ИФА – Бест» все образцы были определены как положительные. Параллельно было проведено тестирование образцов данной панели с помощью трех наборов зарубежных компаний: «Abbott Murex HBsAg (V3)», «Ensygnost HBsAg 5.0», «Monolisa HBsAg ULTRA». В большинстве случаев коэффициенты позитивности образцов, полученные при использовании набора реагентов «HBsAg – ИФА – Бест», оказались более высокими по сравнению с показателями, полученными в наборах сравнения. Это

свидетельствует о более высокой чувствительности набора реагентов «HBsAg – ИФА – Бест» в отношении исследованных мутантных вариантов HBsAg.

Проведено сравнительное исследование по выявлению нативного мутантного HBsAg (субтипа adw3, с мутацией G 145 R, генотипа D) в образце сыворотки инфицированного человека с помощью набора реагентов «HBsAg – ИФА – Бест» и 5 наборов разных отечественных и зарубежных производителей: «ВектогенВ-HBs-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест»), «ДС-ИФА-HBsAg-0,01» (НПО «Диагностические системы»), «Monolisa HBsAg ULTRA», «Ensygnost HBsAg 5.0», «Abbott Murex HBsAg (V3)». Были определены титры данной сыворотки в каждом наборе. Титр сыворотки варьировал от 1:10 до 1:100000 в зависимости от используемого набора. Таким образом, коммерческие наборы значительно различаются (до 10000! раз) по способности выявлять HBsAg с аминокислотными заменами, соответствующими этой мутации в s-гене ВГВ. Использование набора реагентов «HBsAg – ИФА – Бест» позволяет определять такой HBsAg в весьма низких концентрациях – разведении сыворотки 1:100000.

**По вопросам, касающимся качества набора
«HBsAg – ИФА – Бест»**

следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район,
п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 227-75-43,
тел./факс (383), 336-60-30

и в Федеральное государственное учреждение науки
«Государственный НИИ стандартизации и контроля
медицинских биологических препаратов
им. Л.А.Тарасевича» Роспотребнадзора
по адресу:

119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41,
тел. 241-39-22;

**За справками и консультацией обращаться:
в лабораторию маркеров вирусных инфекций,**

тел. (383) 227-75-40.

10.03.10.

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
ТОРСН-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: www.vector-best.ru