

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
HBs-антигена вируса гепатита В

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

HBsAg-ИФА-Бест (комплект № 2)

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-0543

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 178 неизвестных образцов, 14 контрольных образцов, всего 192 определений при использовании двух планшетов.

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 перок-

сидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. После добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–650 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- иммуносорбент – планшет с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg, готовый для использования – 2 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+ ; прозрачная или с легкой опалесценцией жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,0 мл;
- слабopоложительный контрольный образец, инактивированный (K^+ _{слаб}; концентрация HBsAg $(0,05 \pm 0,02)$ МЕ/мл; прозрачная или с легкой опалесценцией жидкость желто-коричневого цвета) – 1 фл., 1,0 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^- ; прозрачная или с легкой опалесценцией жидкость желтого цвета) – 1 фл., 1,0 мл;
- конъюгат №1, концентрат (биотинилированные поликлональные антитела к HBsAg, прозрачная жидкость синего цвета) – 2 фл. по 1,0 мл;
- конъюгат №2, концентрат (стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена; прозрачная жидкость зеленого цвета) – 2 фл. по 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) – 2 ф. по 7,0 мл;
- раствор для разведения конъюгата № 2 (РРК №2; прозрачная бесцветная жидкость) – 2 фл. по 12,0 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР; прозрачная бесцветная жидкость) – 2 фл. по 13,0 мл;
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ; прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 2 фл. по 1,0 мл;
- стоп-реагент (прозрачная бесцветная жидкость) – 2 фл. по 12,0 мл.
- пленка для заклеивания планшета – 4 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 6 шт.;
- наконечники для пипеток – 48 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. Специфичность набора, определенная по стандартной панели сывороток, не содержащих HBsAg (СОП-06-20) – 100%.

4.2. Чувствительность набора (минимальная концентрация HBsAg, определенная 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, СБР, 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;

- не допускайте высыхания стрипов в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов;

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

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

- необходимо следить за состоянием промывочного устройства – регулярно обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом;

- 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 приготовления конъюгата и рабочего раствора ТМБ; **обращаем Ваше особое внимание** на то, что малейшее, даже не видимое глазом загрязнение пипеток раствором конъюгата может привести к контаминации всего содержимого фла-

конов 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.

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–650 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 гемолизированную, 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 объема не более 5%.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

(расчет на один планшет)

8.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре 18–25°C в течение 60 мин.

8.2. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Непосредственно перед использованием цефленовый пакет с планшетом вскрыть со стороны застежки, отступив примерно 1 см, и извлечь планшет.

8.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА

Рабочий промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз.

При выпадении осадка солей в концентрате ФСБ-Т необходимо прогреть его при температуре (30–40)°С до полного растворения осадка.

Содержимое флакона с 25-кратным концентратом фосфатно-солевого буферного раствора с твином перенести в чистую емкость, добавить 672 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

Хранение: не более 5 суток при 2–8°C.

8.4. ПОДГОТОВКА КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

После отбора части содержимого контрольные образцы можно хранить при температуре 2–8°C в течение всего срока годности.

8.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЬЮГАТА № 1

Во флакон с раствором для разведения конъюгата №1 добавить 0,7 мл концентрата конъюгата №1 и тщательно перемешать.

Хранение: до 6 часов при 18–25°C.

8.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЬЮГАТА № 2

Во флакон с раствором для разведения конъюгата №2 добавить 1,2 мл концентрата конъюгата №2 и тщательно перемешать.

Хранение: до 6 часов при 18–25°C.

8.7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА

Во флакон с субстратным буферным раствором добавить 650 мкл концентрата тетраметилбензидина и 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.*

8.8. Стоп-реагент готов к использованию.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Внесение контрольных и исследуемых образцов.

В лунки планшета, например, А-1, В-1, С-1 внести по 100 мкл K^- ; в лунки D-1 и E-1 – по 100 мкл K^+ ; в лунки F-1 и G-1 – по 100 мкл K^+ _{слаб.}; в остальные – по 100 мкл исследуемых образцов.

9.2. Внести во все лунки по 50 мкл рабочего раствора конъюгата № 1 (п. 8.5), *не касаясь наконечниками стенок лунок!*

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

9.3. Инкубировать в термостатируемом шейкере с интенсивностью перемешивания 700–800 об/мин: 40 мин при 42°C или 60 мин при 37°C.

9.4. По окончании инкубации содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть планшет с помощью автоматического или ручного промывателя 5 раз (**использование многоканальной пипетки не допускается**), добавляя во все лунки **не менее 400 мкл** рабочего промывочного раствора (п. 8.3). Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. **Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмыв-**

ки (остаточный объем не должен превышать 10 мкл). Остатки промывочного раствора из лунок тщательно удалить, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Примечание: Промывку при помощи автоматического промывателя рекомендуется проводить 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. 8.6.).

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

9.6. Инкубировать в термощейкере с интенсивностью перемешивания 700–800 об/мин: в течение 30 мин при температуре 42°C или 30 мин при 37°C.

9.7. По окончании второй инкубации содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть планшет 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. 8.7) 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.

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

10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

10.1. ТЕРМОШЕЙКЕР 42°C.

- Внести:** по 100 мкл K^+ , K^+ _{слаб.}, K^- , анализируемых образцов.
- Внести:** по 50 мкл рабочего раствора конъюгата №1.
- Инкубировать:** 40 мин, 42°C, 700–800 об/мин.
- Промыть:** рабочим промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора конъюгата №2.
- Инкубировать:** 30 мин, 42°C, 700–800 об/мин.
- Промыть:** рабочим 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 620–650 нм.

10.2. ТЕРМОШЕЙКЕР 37°C.

Внести: по 100 мкл K^+ , K^+ _{слаб.}, K^- , анализируемых образцов.

Внести: по 50 мкл рабочего раствора конъюгата №1.

Инкубировать: 60 мин, 37°C, 700–800 об/мин.

Промыть: рабочим промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл рабочего раствора конъюгата №2.

Инкубировать: 30 мин, 37°C, 700–800 об/мин.

Промыть: рабочим 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-реактента.

Измерить: ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–650 нм.

11. 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 нм–650 нм; допускается измерение на одной длине волны – 450 нм. Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

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} К⁻.

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

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}} \text{К}^- + 0,05$$

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 К⁻ в каждой лунке должно находиться в пределах от 0,6 × ОП_{ср} К⁻ до 1,4 × ОП_{ср} К⁻. Значение ОП К⁻, выходящее

из этих пределов, следует исключить, а $ОП_{ср} K^-$ пересчитать.

12.2.3. Среднее значение оптической плотности в лунках с положительным контрольным образцом должно быть не менее 1,0 ед. опт. плотн.

12.2.4. Среднее значение оптической плотности в лунках 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».

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

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

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

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, 332-37-58,

тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52,

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

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.

21.12.09.

**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