

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного
выявления HBsAg

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Вектоген В – HBs-антиген
(комплект 3)

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-0556

«Вектоген В – HBs-антиген» (комплект 3)

представляет собой набор реагентов для выявления HBsAg вируса гепатита В разных субтипов и мутантных форм (в том числе в 143 и 145 аминокислотных положениях) методом иммуноферментного анализа (ИФА). Принцип метода заключается во взаимодействии HBsAg с моноклональными антителами, иммобилизованными на поверхности лунок разборного полистиролового планшета. Комплекс «антиген-антитело» выявляют с помощью конъюгата поликлональных антител с пероксидазой хрена.

Набор содержит все необходимые для проведения ИФА реагенты, кроме дистиллированной воды.

Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Предусмотрено использование набора частями, в зависимости от количества проб (от 4 анализируемых образцов до 89). Возможны 12 независимых постановок ИФА.

Минимальная концентрация HBsAg, выявляемая с помощью настоящего набора, составляет по стандартному образцу (СО) HBsAg 0,05 МЕ/мл при процедурах 1 и 2; 0,01 МЕ/мл при процедуре 3 (см. п. 3.2.4).

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для выявления HBsAg в сыворотке (*плазме*) крови человека и может быть использован для обследования доноров крови, органов, тканей человека и дифференциальной диагностики вирусных гепатитов.

2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к HBsAg – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+), содержит 4 ± 2 МЕ/мл HBsAg ауw2 субтипа (*прозрачная жидкость красного цвета*) – 1 фл., 1,5 мл;
- слабоположительный контрольный образец, инактивированный (K^+ *слаб*), содержит $0,2 \pm 0,1$ МЕ/мл HBsAg ауw3 субтипа (*лиофильно высушенная масса кремового цвета*) – 1 фл.;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^-), прозрачная или с лёгкой опалесценцией жидкость жёлтого цвета – 1 фл., 2,5 мл;
- конъюгат, концентрат – поликлональные антитела к HBsAg, меченые пероксидазой хрена; жидкость синего цвета – 1 фл., 0,8 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК), прозрачная опалесцирующая жидкость – 1 фл., 8 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР), прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл;
- плёнка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки – 16 шт.

3. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- * работать в резиновых перчатках;
- * не пипетировать растворы ртом;
- * все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113.

Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

- Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5%.
- Желательно использовать свежееотобранные образцы сыворотки (*плазмы*) крови. Допускается использование образцов, хранившихся при (2-8)°С не более 5 суток, либо при минус (20-40)°С, если необходимо более длительное хранение.
- Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15 мин при 3000 об/мин.
- Нельзя использовать проросшие, гемолизи-

рованные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при комнатной температуре (18-25)°С.
- Лиофилизированные компоненты должны быть восстановлены, как минимум, за 15 минут до их использования.
- Сразу после постановки реакции неиспользованный планшет и плотно закрытые флаконы с исходными компонентами необходимо поместить в холодильник (2-8)°С.
- Растворы ТМБ и конъюгата готовить непосредственно перед использованием. Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.
- При промывке лунки (*стрипа, планшета*) заполнять полностью (**400 мкл промывочного раствора**), не допуская переливания промывочного раствора через края лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Для автоматических промывателей рекомендуется режим промывки с переполнением (**overflow**).
- При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за со-

стоянием ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно ёмкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

- Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями.
- 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 повторное использование планшета для предварительного нанесения сывороток.
- При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.
- Ванночки, используемые для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.
- В случае повторного использования ванночки для раствора конъюгата промыть дистиллированной водой; ванночки для раствора ТМБ сразу после работы промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.
- Для дезинфекции посуды и материалов, кон-

тактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (*четвертичных аммониевых соединений*), спиртов, третичных аминов.

- Пипетки и рабочие поверхности во время проведения ИФА обрабатывать 70% раствором этилового спирта. Не использовать во время проведения ИФА перекись водорода, хлорамин и т.д.

3.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

3.1.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с концентратом ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество концентрата ФСБ-Т×25 (*см. таблицу, стр. 10*) и развести его дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до **700 мл**.

Хранение: при (2-8)°C до 72 ч.

Таблица расхода реагентов

| Количество используемых стрипов | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Промывочный раствор | | | | | | | | | | | | |
| ФСБ-Т×25, мл | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Дистиллированная вода, мл | до 25 | до 50 | до 75 | до 100 | до 125 | до 150 | до 175 | до 200 | до 225 | до 250 | до 275 | до 300 |
| Раствор конъюгата | | | | | | | | | | | | |
| Конъюгат (концентрат), мкл | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 | 350 | 400 | 450 | 500 | 550 | 600 |
| РК, мл | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 2,5 | 3,0 | 3,5 | 4,0 | 4,5 | 5,0 | 5,5 | 6,0 |
| Раствор ТМБ | | | | | | | | | | | | |
| ТМБ (концентрат), мкл | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 | 350 | 400 | 450 | 500 | 550 | 600 |
| СБР, мл | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 6,0 | 7,0 | 8,0 | 9,0 | 10,0 | 11,0 | 12,0 |

3.1.2. Слабоположительный контрольный образец

Во флакон с $K^+_{слаб}$ добавить **500 мкл дистиллированной воды** и тщательно перемешать до полного растворения сыворотки. Выдержать при комнатной температуре в течение 15 мин.

Использовать в течение рабочего дня (8-10 ч).

Слабоположительный контрольный образец $K^+_{слаб}$ аттестован по ОСО HBsAg ГИСК им. Л.А. Тарасевича и предназначен для контроля качества лабораторной постановки ИФА.

3.1.3. Раствор конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые накопечники.

В соответствии с числом стрипов в пластиковую ванночку отобрать необходимое количество **концентрата конъюгата** (см. таблицу) и добавить соответствующее количество раствора для разведения конъюгата (**РК**), тщательно перемешать пипетированием.

Использовать в течение рабочего дня (8-10 ч).

3.1.4. Раствор ТМБ в рабочем разведении

Внимание! Раствор ТМБ готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с ТМБ.

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество ТМБ (см. таблицу) и добавить соответствующее количество СБР, тщательно перемешать пипетированием.

Раствор стабилен в защищённом от света месте при (18-25)°С до 3-х ч.

3.2. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

3.2.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы необходимо снять с рамки, поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застёжкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при (2-8)°С до конца срока годности.

Приготовить промывочный раствор (п. 3.1.1), слабоположительный контрольный образец (п. 3.1.2) и раствор конъюгата (п. 3.1.3).

3.2.2. Внести в 2 лунки по 100 мкл K^- , в 1 лунку – 100 мкл K^+ *слаб.* в 1 лунку – 100 мкл K^+ . В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых сывороток. При постановке анализа на

2 и более стрипах для K^- использовать 3 лунки, для K^+ , K^+ *слаб.* – по 2 лунки.

3.2.3. Во все лунки внести по 50 мкл приготовленного раствора конъюгата в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

3.2.4. Стрипы заклеить клейкой плёнкой и инкубировать в соответствии с выбранной процедурой:

процедура 1 — 44°С 1 час, шейкер, 500 об/мин;
процедура 2 — 37°С 2 часа, шейкер, 500 об/мин;
процедура 3 — 37°С 18±0,5 часов.

3.2.5. По окончании инкубации содержимое лунок с образцами собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором. Лунки стрипов промыть 5 раз промывочным раствором. Затем необходима однократная промывка дистиллированной водой для удаления остатков солевого буфера с твином.

Внимание! При ручной промывке стрипов каждую лунку необходимо заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге. *Не допускать высыхания лунок между отдельными операциями при постановке реакции.*

При использовании автоматического промывателя рекомендуется режим промывки с переполнением (*overflow*) и крестообразная аспирация (*crosswise*).

3.2.6. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении (*n. 3.1.4*).

Внести во все лунки по **100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении.**

Внимание! Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Выдерживать стрипы в защищённом от света месте при (18-25)°C **30 мин** или при 37°C 20 мин.

3.2.7. Реакцию остановить добавлением в лунки по **100 мкл стоп-реагента** и через 2-3 мин измерить оптическую плотность (ОП).

Внимание! Следует избегать попадания стоп-реагента (0,5 М H₂SO₄) на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

4. РЕГИСТРАЦИЯ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм. Выведения спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

4.1. Оценка отрицательных и положительных контролей.

4.1.1. Вычислить среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с K⁻ (ОП_{ср} K⁻), K⁺ (ОП_{ср} K⁺) и K⁺_{слаб} (ОП_{ср} K⁺_{слаб}).

4.1.2. Значение ОП_{ср} K⁺ должно быть не менее 1,0 ед. опт. пл.

4.1.3. Значение ОП_{ср} K⁻ не должно превышать 0,10 ед. опт. пл. при использовании двухволнового режима измерения или 0,15 ед. опт. пл. при измерении на одной длине волны.

4.1.4. Значения ОП K⁻ должны быть в пределах от 0,6 × ОП_{ср} K⁻ до 1,4 × ОП_{ср} K⁻. Исключить ОП K⁻, выходящие из этих пределов, и пересчитать ОП_{ср} K⁻. При этом должно остаться больше половины отрицательных контролей.

4.1.5. Вычислить критический уровень оптической плотности (ОП_{крит}) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} K^- + 0,04.$$

4.1.6. Значение $ОП_{ср} K^+_{слаб}$ должно превышать $ОП_{крит}$.

Если хотя бы одно из условий, перечисленных выше, не выполняется, необходимо найти ошибку, устранить и провести анализ заново.

5. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Положительными считать образцы с ОП, **превышающей или равной** $ОП_{крит}$. Положительный результат означает, что тестируемый образец содержит HBsAg или неспецифически реагирующий агент.

Образцы, давшие первичный **положительный результат**, должны быть исследованы с помощью набора «**Вектоген В – HBs-антиген**» (*комплект 5 / подтверждающий тест*) с целью подтверждения результата.

Отрицательными считать образцы, имеющие ОП **меньше** $ОП_{крит}$. **Отрицательный** результат указывает, что тестируемая сыворотка **не содержит HBsAg** или содержит HBsAg в концентрации ниже определяемого тест-системой уровня.

Если первично положительная сыворотка **при подтверждении** в наборе «**Вектоген В – HBs-антиген**» (*комплект 5 / подтверждающий тест*) дала отрицательный результат, то

сыворотку признают **отрицательной**, не содержащей HBsAg.

Первичный положительный результат может быть вызван:

а) случайным заносом микроколичеств высокотитражной положительной по HBsAg сыворотки через пипетку или наконечник;

б) свойством некоторых образцов сыворотки или плазмы неспецифически реагировать с поверхностью лунки;

в) загрязнением реакционной смеси с субстратом для пероксидазы ионами металлов;

г) некачественной промывкой лунок планшета;

д) загрязнившимся дном планшета.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Наборы хранить и транспортировать при (2-8)°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток.

Не допускать замораживания!

Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться

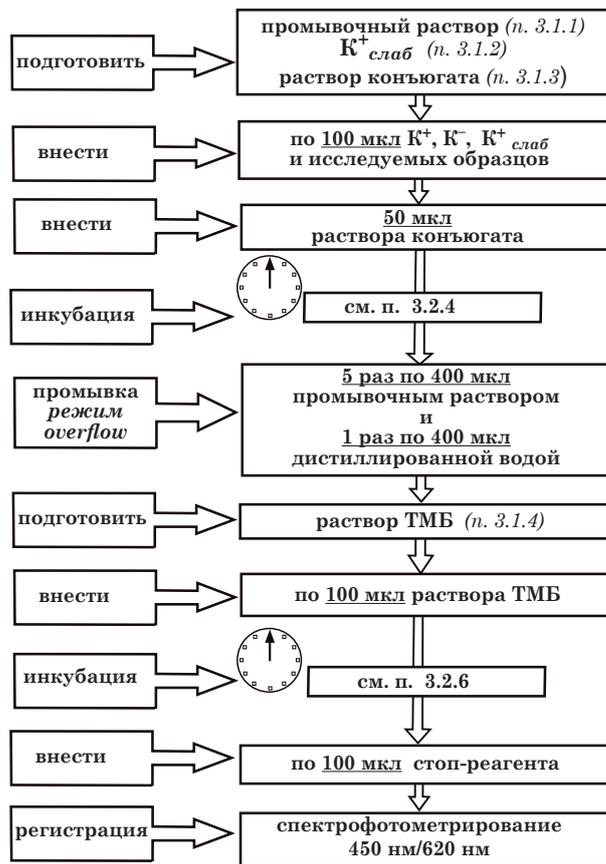
в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

*630128, г. Новосибирск-128, а/я 102,
тел.: (383) 332-92-49, 227-60-30;
тел./факс: (383) 332-94-47, 332-94-44;
E-mail: plkobtk@vector-best.ru*

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 332-24-45.

24.09.10

Схема анализа D-0556



**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 путём
ВИЧ-инфекция
TORCH-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.: (383) 332-37-58, 332-37-10, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

E-mail: vbmarket@online.nsk.su

Internet: www.vector-best.ru