

ВЕКТОР



Набор реагентов  
для иммуноферментного выявления  
иммуноглобулинов класса М к core-антигену  
вируса гепатита В

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

---

**Вектор HBcAg-IgM**

НАБОР РЕАГЕНТОВ  
**D-0564**





## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «ВектоНВсAg-IgM» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к core-антигену вируса гепатита В (IgM к НВсAg) в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

**1.3.** Набор адаптирован для постановки ИФА на аналитических анализаторах открытого типа («LAZURITE», производитель «DYNEX TECHNOLOGIES»; «TECAN Freedom EVOLyzer», производитель «TECAN»; «EVOLIS», производитель «BIO-RAD» и др.).

## **2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**

### **2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА**

Определение IgM к core-антигену вируса гепатита В проводится методом иммуноферментного анализа (метод «захвата»). Метод основан на взаимодействии IgM, содержащихся в сыворотке крови, с моноклональными антителами против IgM человека, иммобилизованными в лунках полистиролового планшета. Специфические IgM к НВсAg выявляют с помощью конъюгата рекомбинантного НВсAg с пероксидазой хрена.

Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и спектрофотометрически измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-волне в диапазоне 620–655 нм. Степень окраски пропорциональна концентрации IgM к НВсAg в анализируемых образцах.

## 2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к иммуноглобулинам класса М человека – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный ( $K^+$ ; прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный ( $K^-$ ; бледно-желтая с легкой опалесценцией жидкость) – 1 фл., 2,5 мл;
- раствор для разведения сывороток (PPC; прозрачная жидкость фиолетового цвета) – 1 фл., 12 мл;
- конъюгат (рекомбинантный НВсAg, меченный пероксидазой хрена; прозрачная жидкость синего цвета) – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25; прозрачная бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей) – 2 фл. по 28 мл;

- раствор ТМБ (прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент (прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток – 16 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

## 2.3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**2.3.1. Специфичность** набора при исследовании отрицательных сывороток стандартной панели предприятия (СПП<sup>-</sup>) составляет 100 %.

**2.3.2. Чувствительность** набора – выявление специфических IgM к НВсAg в стандартном образце предприятия (СОП<sup>+</sup>) в титре не менее 1:3200.

## 3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**3.1.** Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

**3.2.** 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.*

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

**3.4.** При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как исследуемые образцы сывороток крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные передавать возбудителей вирусных и бактериальных инфекций.

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

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

**3.7.** 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 ( $H_2O_2$ ,

деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

**3.8. 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, которые 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;

- перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протирать конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона с раствором ТМБ;

- 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.

#### **4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ**

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения спектрофотометр, 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 620–655 нм;
- термостат или термошейкер орбитального типа, поддерживающий температуру  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменны-

- ми наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл;
  - промыватель автоматический или ручной для планшетов;
  - перчатки резиновые хирургические;
  - бумага фильтровальная лабораторная;
  - цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100, 1000 мл;
  - флаконы стеклянные, вместимостью 10–15 мл;
  - вода дистиллированная.

## **5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

**5.1.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

**5.2.** 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. Допускается однократное замораживание / оттаивание образцов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

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

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

## **6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ И РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИФА**

**6.1.** Перед проведением анализа исследуемые образцы и все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, следует выдержать при температуре от 18 до 25°C не менее 60 мин.

**6.2.** Отрицательный контрольный образец, положительный контрольный образец, конъюгат, раствор ТМБ и стоп-реагент готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

### **6.3. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА**

**6.2.1.** Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

**6.2.2.** После отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение всего срока годности набора.

**6.2.3.** При постановке ИФА на автоматических анализаторах флаконы, входящие в состав набора, не помещать непосредственно в камеру анализатора, а необходимое количество компо-

**Таблица расхода компонентов набора реагентов**

Количество используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл
1	1,0	1,0	2,0	До 50
2	2,0	2,0	4,0	До 100
3	3,0	3,0	6,0	До 150
4	4,0	4,0	8,0	До 200
5	5,0	5,0	10,0	До 250
6	6,0	6,0	12,0	До 300
7	7,0	7,0	14,0	До 350
8	8,0	8,0	16,0	До 400
9	9,0	9,0	18,0	До 450
10	10,0	10,0	20,0	До 500
11	11,0	11,0	22,0	До 550
12	12,0	12,0	24,0	До 600

нентов для каждой постановки отбирать в отдельную чистую емкость. Исключение составляет стоп-реагент – взаимозаменяемый компонент для всех наборов ЗАО «Вектор-Бест», не требующий хранения в холодильнике в течение всего срока годности.

#### 6.4. 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.*

## 6.5. 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 от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

*Хранение: до 5 суток при 2–8°C.*

## 6.6. ПОДГОТОВКА КОНЪЮГАТА

В зависимости от числа используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (*не сливать во флакон с исходным конъюгатом*).

## 6.7. ПОДГОТОВКА РАСТВОРА ТМБ

В зависимости от числа используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов), отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ.

Остатки раствора ТМБ из флакона или ванночки утилизировать (**не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ**).

**Внимание!** Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

**Внимание!** Внесение контрольных и исследуемых образцов проводить достаточно быстро, в течение 10–15 мин, так как при более длительном внесении образцов в лунки планшета время инкубации первого и последнего образцов значительно отличаются, что может привести к неправильной оценке результатов.

**7.1.** Внести контрольные образцы:

- 1 лунка – 100 мкл  $K^+$ ;
- 2 лунки – по 100 мкл  $K^-$ .

Например, в лунки А-1 и В-1 внести по 100 мкл  $K^-$ , в лунку С-1 внести 100 мкл  $K^+$ .

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл цельных исследуемых сывороток, тщательно перемешать, при этом цвет раствора меняется с фиолетового на синий. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 10 раз.

Отрезать пленку требуемого размера. Стрип закрыть, плотно прижав пленку. Инкубировать в термостате при температуре  $37^{\circ}C$  в течение 60 мин или в термошейкере орбитального типа 30 мин при  $37^{\circ}C$  и 500 об/мин.

**7.2.** 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. 6.5.), 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.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

**7.3.** В каждую лунку стрипа внести по 100 мкл конъюгата (п. 6.6.).

Отрезать пленку требуемого размера. Стрип закрыть пленкой и инкубировать в термостате

60 мин при 37°C или в термошейкере орбитального типа 30 мин при 37°C и 500 об/мин.

*Для внесения конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

**7.4.** По окончании инкубации промыть лунки 5 раз промывочным раствором, как описано в п. 7.2.

**7.5.** Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ (п. 6.7.) и инкубировать в темноте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°C.

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

**7.6.** Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента.

## **8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референсфильтр в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение оптической плотности на одной длине волны – 450 нм.

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

## 9. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

*Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!*

### 9.1. ТЕРМОШЕЙКЕР

- Внести:** 100 мкл  $K^+$ ,  $K^-$ ;  
по 90 мкл РРС и по 10 мкл цельных исследуемых сывороток.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C, 500 об./мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C, 500 об./мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора ТМБ.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

## 9.2. ТЕРМОСТАТ

- Внести:** по 100 мкл  $K^+$ ,  $K^-$ ;  
по 90 мкл РРС и по 10 мкл цель-  
ных исследуемых сывороток.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл,  
5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл,  
5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора ТМБ.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная  
длина волны 620–655 нм.

## 10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

**10.1.** Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ( $ОП_{ср}K^-$ ).

**10.2.** Результаты анализа учитывать при соблюдении следующих условий:

– значение  $ОП_{ср}K^-$  должно быть не более 0,25 о.е.;

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,8 о.е.

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

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} K^- + 0,2$$

Для интерпретации результатов исследования мы рекомендуем использовать коэффициент позитивности (КП):

$$КП = \frac{ОП_{обр}}{ОП_{крит.}}$$

где  $ОП_{обр}$  – оптическая плотность в лунке с исследуемым образцом.

**10.4.** Если  $КП < 1$ , результат анализа считать **отрицательным**.

Если  $КП \geq 1$ , результат анализа считать **положительным**.

Коэффициент позитивности – удобная и простая величина для оценки изменения концентрации IgM к НВсAg в динамике.

**10.5.** При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации IgM к НВсAg в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

## **11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ**

**11.1.** Набор реагентов 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 не допускается.

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

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

**Интерпретация результатов  
серологических тестов**

КП HBcore IgM	Маркеры HBV-инфекции	Возможные варианты определения стадии HBV-инфекции
$1 \leq \text{КП} \leq 2,5$	HBs Ag+ HBe Ag+/- HBcore IgG+/- HBe IgG -	Ранняя стадия HBV-инфекции
	HBs Ag+ HBcore IgG+ HBe Ag-/+ HBe IgG+/-	Хроническая инфекция
$\text{КП} \geq 5$	HBs Ag+ HBe Ag+/- HBcore IgG+ HBe IgG-/+	Острая фаза HBV-инфекции
$\text{КП} \leq 5$	HBs Ag+/- HBe Ag- HBcore IgG+ HBe IgG+ анти-HBs-	Поздняя стадия острой инфекции
	HBs Ag- HBcore IgG+ HBe IgG+ анти-HBs+	Фаза реконвалесценции

**По вопросам, касающимся качества набора реагентов,**  
следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская обл.,  
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,  
тел. (383) 336-73-46,  
тел./факс (383) 332-67-49,  
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

**За справками и консультацией обращаться:**  
в лабораторию маркеров вирусных инфекций,  
тел. (383) 227-75-40.

01.03.10.



**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  
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./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](mailto:vbmarket@vector-best.ru)  
Internet: [www.vector-best.ru](http://www.vector-best.ru)