

ВЕКТОР



Набор реагентов для иммуноферментного
выявления суммарных антител
к core-антигену вируса гепатита В

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Вектор HBcAg-антитела

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-0566



1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли, или 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контрольные образцы.

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

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Специфическими реагентами набора являются: рекомбинантный core-антиген вируса гепатита В, сорбированный на поверхности лунок полистиролового разборного планшета, конъюгат моноклональных антител к НВсAg с пероксидазой хрена, положительный и отрицательный контрольные образцы.

Способ определения антител к НВсAg представляет собой твердофазный конкурентный

иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сыворотки крови и конъюгата в лунках стрипов с иммобилизованным НВсAg происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-антитело» на поверхности лунок.

После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и конъюгата и добавления в лунки планшета раствора тетраметилбензидина (ТМБ) образуется окрашенный продукт, интенсивность окраски которого обратно пропорциональна концентрации антител к НВсAg в анализируемом образце сыворотки.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок рекомбинантным соге-антигеном вируса гепатита В, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+ ; прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,0 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^- ; прозрачная опалесцирующая жидкость жёлтого цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- конъюгат (моноклональные антитела к НВсAg, меченные пероксидазой хрена; прозрачная жидкость синего цвета) – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25; прозрачная бесцветная жид-

- кость, допускается наличие небольшого осадка солей, исчезающего при нагревании) – 1 фл., 28 мл;
- раствор тетраметилбензидина (прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 13 мл;
 - стоп-реагент (прозрачная бесцветная жидкость) – 1 фл., 12 мл;
 - пленка для заклеивания планшета – 1 шт.;
 - пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
 - наконечники для пипетки – 16 шт.;
 - инструкция по применению – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления антител к НВсAg по Стандартной панели предприятия (СПП), % – 100.

3.2. Чувствительность выявления антител к НВсAg по СПП, % – 100.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000, Административный регламент Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по регистрации изделий медицинского назначения).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными.

Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания

на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реактента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. 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.).

4.4. 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, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на ка-

чество 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.

4.8. 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 конъюгата;

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

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не до-

пускайте 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.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл;
- промывочное устройство для планшет;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл ;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- колба мерная вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки 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) в течение 3 месяцев. Полученные образцы можно замораживать/оттаивать только один раз, т.к. повторное замораживание/оттаивание приводит к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

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

6.4. Для отбора исследуемых образцов и реагентов использовать пипетки, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);

6.5. Перед постановкой ИФА анализируемые образцы выдержать при температуре от 18 до 25°C не менее 60 мин.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

7.1. 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.

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

7.3. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

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

7.3.2. После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крыш-

ками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение всего срока годности набора.

7.4. 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 набора.

7.5. 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) 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: не более 5 суток при 2–8°C.

7.6. ПОДГОТОВКА КОНЪЮГАТА

В зависимости от числа используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в

**Таблица расхода компонентов набора реагентов
для ручной постановки**

Количество используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т, концентрат (мл)	Дистил. 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

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)**.

7.7. 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.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

При детальном использовании набора не помещать флаконы, входящие в состав набора, в камеру анализатора, а для каждой постановки необходимое количество компонентов 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.

Внесение контрольных и исследуемых образцов проводить достаточно быстро, в течение 5–7 мин, так как при длительном времени внесения образцов в лунки планшета времени инкубации первого и последнего образцов значи-

тельно отличаются, что может привести к неправильной оценке результатов.

8.1. Внести контрольные образцы:

- **1 лунка** – 50 мкл K^+ ;
- **2 лунки** – по 50 мкл K^- .

Например, в лунки А-1 и В-1 внести по 50 мкл K^- , а в лунку С-1 – 50 мкл K^+ .

В остальные лунки внести по 50 мкл цельных исследуемых сывороток.

8.2. Во все лунки с контрольными и исследуемыми образцами внести по 100 мкл конъюгата.

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

8.3. Планшет заклеить липкой пленкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре $37^{\circ}C$.

8.4. 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. 7.5.), 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.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ и инкубировать в темноте в течение 25 мин при температуре 18–25°C.

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

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

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр 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.

10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести: по 50 мкл K^+ , K^- ;
по 50 мкл цельных исследуемых сывороток.

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-реактента.
Измерить: ОП при 450 нм / референсная
длина волны 620–655 нм.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

11.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОП_{ср}К⁻).

11.2. Значение оптической плотности (ОП) в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не более 0,2.

Отношение среднего значения оптической плотности в лунках с отрицательным контролем к ОП положительного контрольного образца должно составлять не менее 4,0.

11.3. Только при соблюдении положений п. 11.2 можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

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

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \frac{\text{ОП}_{\text{ср}} \text{К}^-}{2}$$

11.5. Результат анализа считают **положительным**, если $ОП_{обр} \leq ОП_{крит}$.

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

где $ОП_{обр}$ – оптическая плотность анализируемых образцов.

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

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Набор «ВектоНВсАg – антитела» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание набора не допускается.

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

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

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

630559, Новосибирская область,
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

17.03.10.

**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