

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса G
к core-антигену вирусу гепатита В

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Гепабест анти-НВс-IgG

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-0574

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ГепаБест анти-НВс-IgG» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к core-антигену вируса гепатита В в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях, а также службой крови.

1.3. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные образцы. Для исследования небольших партий проб возможны 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контрольные образцы.

1.4. 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 двухстадийном твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантного core-антигена вируса гепатита В (НВсАg) и моноклональных антител к IgG человека.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют с иммобилизованным на поверхности лунок планшета НВсАg. Имеющиеся в сыворотке специфические антитела к НВсАg связываются с антигеном, формируя комплекс «антиген-антитело». На второй стадии связавшиеся специфические IgG взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена.

Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина (ТМБ). Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность (ОП) растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм, референс-волне в диапазоне 620–655 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к НВсАg в анализируемых образцах.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный с иммобилизованным рекомбинантным НВс-антигеном – 1 шт.;

- положительный контрольный образец, инактивированный (K^+ ; прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- слабopоложительный контрольный образец, инактивированный (K^+ _{слаб}; прозрачная жидкость зеленого цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^- ; прозрачная жидкость желтого цвета) – 1 фл., 2,5 мл;
- раствор для разведения сывороток (PPC; прозрачная жидкость фиолетового цвета) – 1 фл., 12 мл;
- конъюгат (прозрачная жидкость синего цвета) – 1 фл., 13 мл;
- фосфатно-солевой буферный раствор с твином, концентрат (ФСБ-Т×25; бесцветная прозрачная жидкость, возможно выпадение осадка солей) – 2 фл. по 28 мл;
- раствор тетраметилбензидаина (прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент (бесцветная прозрачная 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.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность при проверке отрицательных сывороток стандартной панели предприятия, не содержащих иммуноглобулины класса G к НВсAg, составляет 100%.

3.2. Чувствительность при проверке положительных сывороток стандартной панели предприятия, содержащих иммуноглобулины класса G к НВсAg, составляет 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

4.2. 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.*

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, вирусы гепатита или возбудитель любой другой инфекции.

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 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.

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 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.

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

- 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, 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 до 350 мкл;
- промыватель для планшет автоматический или ручной;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100, 1000 мл;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови должен производиться согласно стандартной процедуре забора крови из вены с соответствующими предосторожностями.

6.2. Свежие образцы могут храниться при 2–8°C не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при минус 20°C и ниже не более 6 мес. Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы, содержащие взвешенные частицы компонентов крови, перед анализом должны быть очищены центрифугированием в течение 5 минут при 5–10 тыс.об/мин.

6.4. Не использовать образцы с выраженной гиперлипидемией, с признаками гемолиза.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. 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.

7.2. Отрицательный, положительный и слабоположительный контрольные образцы, конъюгат, раствор ТМБ и стоп-реагент готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

7.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

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

7.2.2. 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.

7.2.3. При постановке ИФА на автоматических анализаторах флаконы, входящие в состав набора, не помещать непосредственно в камеру анализатора, а необходимое количество компонентов 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.

7.3. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимые 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.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

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

7.4. 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 от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

Хранение: не более 5 суток при 2–8°C.

7.5. ПОДГОТОВКА КОНЪЮГАТА

В соответствии с числом 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)**.

Хранение: до 3 часов при 18–25°C

7.6. ПОДГОТОВКА РАСТВОРА ТМБ

В соответствии с числом 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 (ИФА)

8.1. Внести контрольные образцы:

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

8.2. Отрезать пленку требуемого размера. Лунки планшета закрыть, плотно прижав пленку. Инкубировать 30 мин при 37°C.

8.3. 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. 7.4.), 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. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата. Отрезать пленку требуемого размера. Лунки планшета закрыть пленкой. Инкубировать 30 мин при 37°C.

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

8.5. Планшет закрыть пленкой и инкубировать 30 мин при 37°C.

8.6. По окончании инкубации планшет промыть, как указано в п.8.3.

8.7. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора ТМБ (п. 7.6.). Планшет поместить в защищенное от света место и выдержать в течение 25 мин при температуре 18–25°C.

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

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

Избегайте контакта с раствором ТМБ и стоп-реагентом. В случае попадания раствора ТМБ или стоп-реагента на кожу и слизистые оболочки необходимо немедленно смыть их большим количеством проточной воды.

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность 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 внимательного ознакомления с инструкцией!

- Внести:** по 100 мкл K^+ , K^+ _{слаб.}, K^- ;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл цельных анализируемых образцов.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 30 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. РАСЧЕТЫ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. РАСЧЕТЫ

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

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

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} K^- + 0,3.$$

11.2. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

11.2.1. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом не должно превышать 0,20 ед. опт. плотн.

11.2.2. Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 1,00 ед. опт. плотн.

11.2.3. Значение оптической плотности в лунке со слабopоложительным контрольным образцом должно быть не менее $ОП_{крит}$.

11.2.4. Результат анализа считать **положительным**, если $ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$, где $ОП_{обр}$ – значение оптической плотности в лунке с анализируемым образцом.

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

11.2.5. Слабopоложительный контрольный образец служит для контроля качества постановки ИФА. $K^+_{слаб}$ можно использовать для оценки воспроизводимости результатов измерений в лаборатории.

11.2.6. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации иммуноглобулинов класса G к core-антигену вируса гепатита В в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

12.1. Набор реагентов «ГепатБест анти-НВс-IgG» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности (12 мес.). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 суток.

Замораживание компонентов набора не допускается.

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

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 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.

05.04.10.

**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
Internet: www.vector-best.ru