

ВЕКТОР



Набор реагентов  
для иммуноферментного выявления  
Е-антигена вируса гепатита В

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

---

---

**ВекторНВе-антиген**

НАБОР РЕАГЕНТОВ  
**D-0576**





## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «ВектоHBe-антиген» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления E-антигена вируса гепатита В (HBeAg) в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Набор реагентов может быть использован в клинических исследованиях для диагностики гепатита В, определения активности инфекционного процесса, прогнозирования исхода инфекции.

**1.3.** Набор рассчитан на проведение анализа 96 исследуемых образцов, включая контроли, или 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. 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 HBeAg (конъюгат №1) происходит связывание моноклональных антител, иммобилизованных на внутренней по-

верхности лунок, и биотинилированных поликлональных антител к НВеАг анализируемого образца. Во время второй инкубации стрептавидин, меченный пероксидазой (конъюгат №2), связывается с биотинилированными поликлональными антителами к НВеАг, иммобилизованными в ходе первой инкубации. 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 НВеАг в анализируемых образцах.

### 3. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к НВеАг – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный ( $K^+$ ; жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный ( $K^-$ ; жидкость желтого цвета) – 1 фл., 2,5 мл;
- слабopоложительный контрольный образец, инактивированный ( $K^+_{\text{слаб}}$ ; прозрачная жидкость зеленого цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- конъюгат №1 (биотинилированные поликлональные антитела к НВеАг ; жидкость синего цвета) – 1 фл., 8 мл;

- конъюгат №2 (стрептавидин, меченный пероксидазой хрена; жидкость зеленого цвета) – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25; бесцветная прозрачная жидкость, возможно выпадение осадка солей) – 2 фл. по 28 мл;
- раствор тетраметилбензидина (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 – 4 шт.;
- наконечники для пипетки – 32 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

#### **4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

**4.1.** Чувствительность выявления НВеАг при проверке сывороток стандартной панели предприятия, содержащих НВеАг, составляет 100 %.

**4.2.** Специфичность выявления НВеАг при проверке сывороток стандартной панели предприятия, не содержащих НВеАг, составляет 100 %.

#### **5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

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

**5.2.** Все компоненты набора являются нетоксичными.

Стоп-реагент обладает раздражающим действием. *В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пора-*

*женный 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 инфекции.

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

**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 сред-

ства 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, 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 конъюгатами 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 конъюгатов 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.

## **6. 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  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ; или термостатируемый шейкер орбитального типа, поддерживающий температуру  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ , интенсивность перемешивания 700 об/мин;

- 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 планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл, 1000 мл;
- вода дистиллированная.

## **7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

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

**7.2.** Образцы сыворотки (плазмы) крови могут храниться при 2–8°C не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или в течение 3 месяцев замороженными при минус 20°C или ниже. Образцы могут подвергаться замораживанию/оттаиванию только однократно, т.к. повторное замораживание/оттаивание приводит к недостоверным результатам. После размораживания образец следует тщательно перемешать.

**7.3.** HBeAg термолабилен, поэтому необходимо обязательно выдерживать указанный выше температурный режим при хранении и не использовать в анализе сыворотки, инактивированные прогреванием.

**7.4.** Образцы, содержащие осадок, перед анализом должны быть очищены центрифугированием в течение 5 мин при 5–10 тыс.об/мин.

**7.5.** Не следует использовать образцы с выраженной гиперлипидемией.

## **8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

**8.1.** 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.

**8.2.** Отрицательный контрольный образец, положительный контрольный образец, слабоположительный контрольный образец, конъюгат №1, конъюгат №2, раствор ТМБ и стоп-реагент готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

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

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

**8.3.2.** После отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчиваю-

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

#### 8.4. 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.*

#### 8.5. 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: не более 5 суток при 2–8°C.*

**Таблица расхода компонентов набора**

Кол-во используемых стрипов	Конъюгат №1, мл	Конъюгат №2, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
				ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл
1	0,5	1,0	1,0	2,0	до 50
2	1,0	2,0	2,0	4,0	до 100
3	1,5	3,0	3,0	6,0	до 150
4	2,0	4,0	4,0	8,0	до 200
5	2,5	5,0	5,0	10,0	до 250
6	3,0	6,0	6,0	12,0	до 300
7	3,5	7,0	7,0	14,0	до 350
8	4,0	8,0	8,0	16,0	до 400
9	4,5	9,0	9,0	18,0	до 450
10	5,0	10,0	10,0	20,0	до 500
11	5,5	11,0	11,0	22,0	до 550
12	6,0	12,0	12,0	24,0	до 600

### 8.6. ПОДГОТОВКА КОНЪЮГАТА №1

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата №1.

Остатки конъюгата №1 из флакона или ванночки утилизировать **(не сливать во флакон с исходным конъюгатом №1).**

### 8.7. ПОДГОТОВКА КОНЪЮГАТА №2

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата №2.

Остатки конъюгата №2 из флакона или ванночки утилизировать **(не сливать во флакон с исходным конъюгатом №2).**

### 8.8. 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.*

## **9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

**9.1.** Внести контрольные образцы:

- **1 лунка** – 100 мкл  $K^+$ ;
- **1 лунка** – 100 мкл  $K^+$ <sub>слаб</sub>;
- **2 лунки** – по 100 мкл  $K^-$ .

Например, в лунки А-1 и В-1 внести по 100 мкл  $K^-$ ; в лунку С-1 – 100 мкл  $K^+$ ; в лунку D-1 – 100 мкл  $K^+$ <sub>слаб</sub>.

В остальные лунки внести по 100 мкл исследуемых образцов.

**9.2.** Внести во все лунки по 50 мкл конъюгата №1 (п. 8.6.)

Отрезать лишнюю пленку требуемого размера. Закрыть лунки, плотно прижав пленку. Инкубировать в термостате 1 ч при температуре 37°C или 30 мин при температуре 37°C в термешейкере орбитального типа с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

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

**9.3.** 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. 8.5.), 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.

**9.4.** Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата №2 (п. 8.7.).

Отрезать липкую пленку требуемого размера. Закрыть лунки, плотно прижав пленку. Инкубировать в термостате в течение 1 часа при температуре 37°C или 30 минут при температуре 37°C в термошейкере орбитального типа с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

*Внимание! Следует придерживаться выбранного режима инкубации при проведении ИФА, а именно: если Вы проводили первую инкубацию в термостате, то вторую следует проводить там же.*

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

**9.5.** По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть лунки планшета 5 раз так, как указано в п. 9.3.

**9.6.** Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора ТМБ (п. 8.8.). 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.*

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

## **10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допустима также регистрация только с фильтром 450 нм.

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

## 11. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

*Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!*

### 11.1. ТЕРМОШЕЙКЕР

- Внести:** по 100 мкл  $K^+$ ,  $K^+$ <sub>слаб.</sub>,  $K^-$ ;  
по 100 мкл анализируемых образцов.
- Внести:** по 50 мкл конъюгата №1.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C, 700 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата №2.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C, 700 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.

## 11.2. ТЕРМОСТАТ

- Внести:** по 100 мкл  $K^+$ ,  $K^+$ <sub>слаб.</sub>,  $K^-$ ;  
по 100 мкл анализируемых образцов.
- Внести:** по 50 мкл конъюгата №1.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором,  
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата №2.
- 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.

## 12. РАСЧЕТЫ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

### 12.1. РАСЧЕТЫ

12.1.1. Рассчитать среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом –  $ОП_{ср} K^-$ .

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

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} K^- + 0,2$$

### 12.2. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

12.2.1. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом не должно превышать 0,2 ед. опт. пл.

Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 1,0 ед. опт. пл.

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

12.2.2. Результат анализа считать **положительным**, если  $ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$ .

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

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

12.2.3. Слабopоложительный контрольный образец служит для контроля качества постановки ИФА.  $K^+_{слаб}$  можно использовать для оценки

воспроизводимости результатов измерений в лаборатории.

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

### **13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА**

**13.1.** Набор реагентов «ВектоНВе-антиген» 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.

**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  
«ВектоHBe– антиген»,  
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.**

30.04.10.



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