

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

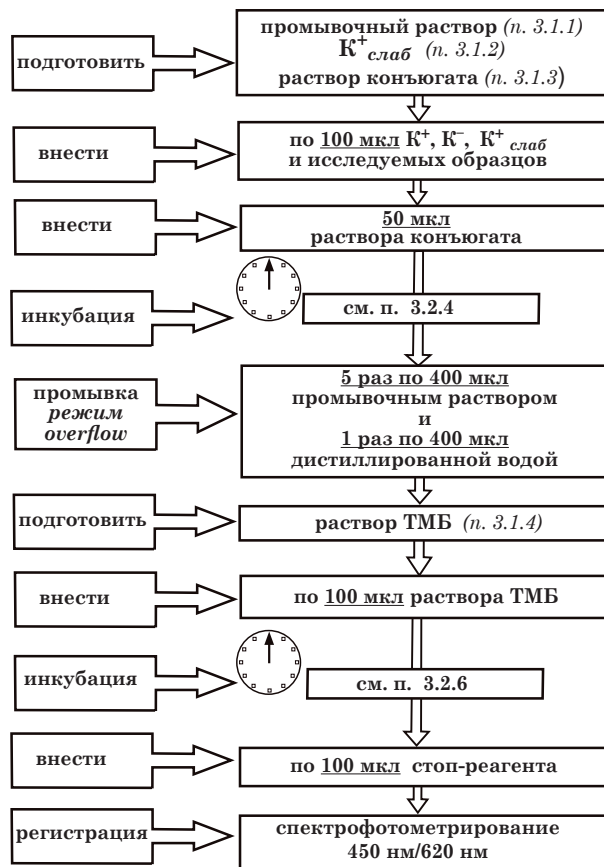
в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

*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