

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^+ _{слаб};
- **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^+ _{слаб}.

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^+ _{слаб.}, 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^+ _{слаб.}, 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
Internet: www.vector-best.ru