

ВЕКТОР

БЕСТ

Набор реагентов
для иммуноферментного
выявления и подтверждения
присутствия HBsAg

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Вектоген В – HBs-антиген
(комплект 5 / подтверждающий тест)

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-0558

«Вектоген В-НВs-антиген (комплект 5 / подтверждающий тест)» представляет собой набор для подтверждения присутствия НВsAg методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), основанного на принципе нейтрализации НВsAg специфическими антителами. НВsAg в конкурентном ИФА нейтрализуется анти-НВs антителами козы (РПА) и не связывается с моноклональными анти-НВs антителами мыши, иммобилизованными на твёрдой фазе. В результате регистрируется снижение оптической плотности (ОП) содержащего НВsAg образца по сравнению с ОП этого же образца в прямом ИФА, где вместо нейтрализующих антител добавлен раствор для разведения без антител к НВsAg (РРО). В случае исследования не содержащего НВsAg (*отрицательного*) или ложноположительного образца не регистрируется снижение ОП сигнала в конкурентном ИФА.

Набор содержит все необходимые для проведения ИФА реагенты, кроме дистиллированной воды.

Набор рассчитан на проведение 48 анализов, включая контроли.

Минимальная концентрация НВsAg, выявляемая с помощью набора, составляет по стандартному образцу (СО) НВsAg 0,05 МЕ/мл при процедурах 1 и 2; 0,01 МЕ/мл при процедуре 3 (см. п. 3.2.5).

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Вектогеп В-НВs-антиген (комплект 5 / подтверждающий тест)» предназначен для подтверждения присутствия НВsАg в образцах сыворотки или плазмы крови. Положительный результат, полученный хотя бы в одной постановке «Вектогеп В-НВs-антиген (комплект 1)», «Вектогеп В-НВs-антиген (комплект 3)», «Вектогеп В-НВs-антиген (комплект 8 / авто)», должен быть подтверждён нейтрализацией специфическими антителами в наборе «Вектогеп В-НВs-антиген (комплект 5 / подтверждающий тест)».

2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами мыши к НВsАg – 1 шт.;
- положительный контрольный образец, инактивированный (К⁺); содержит 4±2 МЕ/мл НВsАg ауw 2 субтипа (прозрачная жидкость красного цвета) – 1 фл., 1,5 мл;
- слабоположительный контрольный образец, инактивированный (К^{+ слаб}); содержит 0,2±0,1 МЕ/мл НВsАg ауw3 субтипа (лиофильно высушенная масса кремового цвета) – 1 фл.;
- отрицательный контрольный образец, инактивированный (К⁻), прозрачная или с лёгкой опалесценцией жидкость жёлтого цвета) – 1 фл., 2,5 мл;
- конъюгат (концентрат, поликлональные антитела к НВsАg, меченые пероксидазой хрена; жидкость синего цвета) – 1 фл., 0,8 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК), прозрачная опалесцирующая жидкость – 1 фл., 8 мл;
- раствор подтверждающего агента (РПА), содержащий нейтрализующие поликлональные антитела козы к НВsАg – 1 фл., 1,5 мл;
- раствор для разведения образца (РРО), содержащий нормальную сыворотку козы – 1 фл., 21 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР), прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 13 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 1.2.731-99 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%.
- 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, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или

подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при (18-25)°С.
- Плотные закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник (2-8)°С, **использовать в течение срока годности набора.**
- Растворы ТМБ и конъюгата готовить непосредственно перед использованием. 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 вошера или ручного промывателя необходимо следить за состоянием ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательна ёмкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

- 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.
- Посуду (*ванночки*), используемые для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.
- В случае повторного использования посуду (*ванночки*) для раствора конъюгата промыть многократно дистиллированной водой. Посуду (*ванночки*) для раствора ТМБ сразу после работы промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.
- Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих 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 только 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 объема или содержимое 1 флакона – до **700 мл**.

Хранение: при (2-8)°C до 72 ч.

3.1.2. Слабоположительный контрольный образец

Во флакон с $K^+_{слаб}$ добавить **500 мкл дистиллированной воды** 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 НВsAg ГИСК им. Л.А. Тарасевича и предназначен для контроля качества лабораторной постановки ИФА.

Таблица расхода реагентов

Количество одновременно используемых стрипов	Раствор конъюгата		Раствор ТМБ		Промывочный раствор	
	Конъюгат (мл)	Раствор для разведения конъюгата (мл)	ТМБ (мл)	СБР (мл)	ФСБ-Тх25 (мл)	Вода (мл)
2	100	1,0	100	2,0	2,0	до 50
4	200	2,0	200	4,0	4,0	до 100
6	300	3,0	300	6,0	6,0	до 150
8	400	4,0	400	8,0	8,0	до 200
10	500	5,0	500	10,0	10,0	до 250
12	600	6,0	600	12,0	12,0	до 300

3.1.3. Раствор конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники.

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. На двух стрипах можно исследовать до 8 образцов, включая контроли. Один стрип используют для постановки прямого ИФА, второй – для постановки конкурентного ИФА.

Оставшиеся стрипы 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 набора.

Приготовить промывочный раствор (п. 3.1.1), слабоположительный контрольный образец (п. 3.1.2) и раствор конъюгата (п. 3.1.3).

Образцы с высоким содержанием НВsAg могут не нейтрализоваться РПА, если они не были разведены. В таком случае необходимо развести образцы в 10, 100, 1000 и т.д. раз и провести анализ разведённых образцов.

Для одного анализа в наборе реагентов «**Вектогеп В-НВs-антиген (комплект 5 / подтверждающий тест)**» необходимо не менее **200 мкл сыворотки**.

3.2.2. Во все лунки стрипов для прямого ИФА внести по **25 мкл РРО**, а во все лунки стрипов для конкурентного ИФА – по **25 мкл РПА**.

3.2.3. Контрольные образцы и исследуемые сыворотки по **100 мкл** внести **одновременно** в лунки стрипов прямого и конкурентного ИФА. Например, в лунки А-1 и А-2 внести по **100 мкл К⁻**, в лунки В-1 и В-2 внести по **100 мкл К⁺**, в лунки С-1, С-2 – по **100 мкл К⁺слаб.** в остальные лунки – **образцы исследуемых сывороток** по **100 мкл** в каждую.

3.2.4. После этого во все лунки добавить по **50 мкл** приготовленного **раствора конъюгата**.

***Внимание!** Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

3.2.5. Стрипы заклеить 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.

3.2.6. По окончании инкубации содержимое лунок стрипов собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором.

Лунки стрипов промыть 5 раз промывочным раствором. Затем необходима однократная промывка лунок стрипов дистиллированной водой для удаления остатков солевого буфера с твином.

***Внимание!** При ручной промывке планшета каждую лунку необходимо заполнять пол-*

ностью (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 перевёрнутыми стрипами по сложенной в несколько слоев 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*).

3.2.7. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении (п. 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.

Выдержать стрипы в защищённом от света месте при (18-25)°C **30 мин** или при 37°C 20 мин.

3.2.8. 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 H_2SO_4) 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. Учёт результатов реакции.

4.1.1. Значение ОП K^- в прямом ИФА (ОП $K^-_{\text{прям}}$) и ОП K^- в конкурентном ИФА (ОП $K^-_{\text{конк}}$) не должны превышать 0,10 ед. опт. пл. при использовании двухволнового режима измерения или 0,15 ед. опт. пл. при измерении на одной длине волны.

4.1.2. Значение ОП K^+ в прямом ИФА (ОП $K^+_{\text{прям}}$) должно быть не менее 1,0 ед. опт. пл., а значение ОП K^+ в конкурентном ИФА (ОП $K^+_{\text{конк}}$) должно быть, как минимум, на 50% ниже ОП $K^+_{\text{прям}}$.

4.1.3. Вычислить критический уровень оптической плотности $OP_{\text{крит}}$:

$$ОП_{крит} = (ОП К^-_{прям} + ОП К^-_{конк}) / 2 + 0,04.$$

Значение ОП $K^+_{слаб}$ в прямом ИФА (ОП $K^+_{слаб\ прям}$) должно быть не менее ОП_{крит}, а значение ОП $K^+_{слаб}$ в конкурентном ИФА (ОП $K^+_{слаб\ конк}$) должно быть, как минимум, на 50% ниже ОП $K^+_{слаб\ прям}$.

4.1.4. Для тех исследуемых образцов, ОП_{прям} которых выше или равна $0,8 \times ОП_{крит}$, рассчитать % подавления сигнала в конкурентном ИФА:

$$\% \text{ подавления} = [(ОП_{прям} - ОП_{конк}) / (ОП_{прям} - ОП_{ср} K^-)] \times 100\%,$$

$$\text{где } ОП_{ср} K^- = (ОП K^-_{прям} + ОП K^-_{конк}) / 2.$$

4.2. Интерпретация результатов.

4.2.1. Если ОП образца ($ОП_{обр}$) в прямом ИФА превышает или равно ОП_{крит} и % подавления больше или равен 50%, то, независимо от величины ОП_{обр} в конкурентном ИФА, **считать, что подтверждение есть (образец содержит HBsAg)**.

4.2.2. Если $ОП_{обр}$ в прямом ИФА меньше $0,8 \times ОП_{крит}$, то независимо от % подавления **считать, что подтверждения нет (образец не содержит HBsAg)**.

4.2.3. В сомнительных случаях, когда $ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < 1,2 \times ОП_{крит}$, а % подавления $< 50\%$ или $0,8 \times ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$, но %

подавления $\geq 50\%$, необходимо повторить анализ. В случае воспроизведения результатов **считать, что подтверждения нет**.

4.2.4. Образцы с ОП в прямом ИФА больше $1,2 \times ОП_{крит}$, а % подавления меньше 50% развести последовательно 1:10, 1:100, 1:1000 и т. д. в РРО, чтобы достигнуть % подавления 50% и более в конкурентном ИФА (*подтверждение*) или ОП разведённого образца меньше $0,8 \times ОП_{крит}$ в прямом ИФА (*нет подтверждения*).

ОП в прямом ИФА	% подавления	Интерпретация
$ОП_{обр} < 0,8 \times ОП_{крит}$	любой	нет подтверждения
$0,8 \times ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$	$\geq 50\%$	сомнительный, исследовать повторно. В случае воспроизведения результатов считать, что подтверждения нет
	$< 50\%$	нет подтверждения
$ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < 1,2 \times ОП_{крит}$	$\geq 50\%$	подтверждение
	$< 50\%$	сомнительный, исследовать повторно. В случае воспроизведения результатов считать, что подтверждения нет
$ОП_{обр} > 1,2 \times ОП_{крит}$	$\geq 50\%$	подтверждение
	$< 50\%$	сомнительный, развести в РРО и исследовать повторно

5. 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

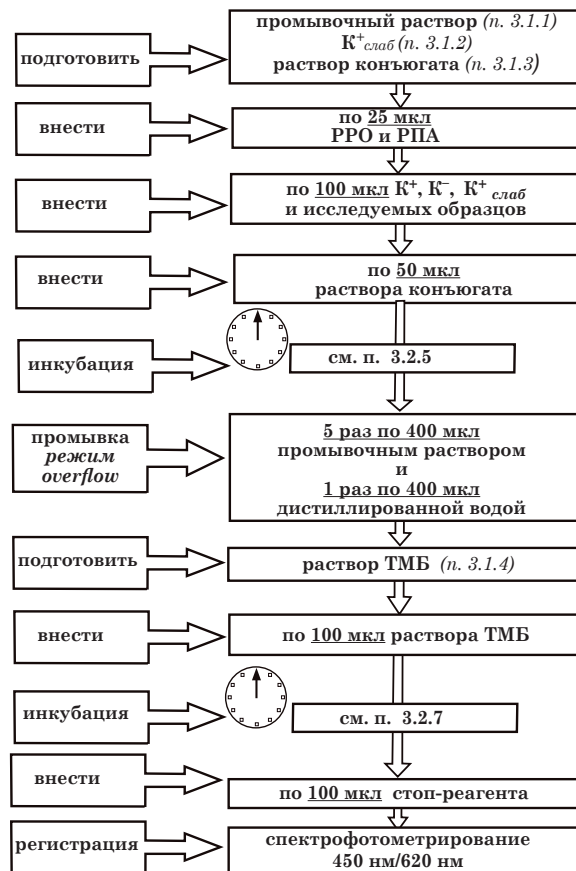
в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

*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-0558



**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