



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов
класса G к core-антигену вируса гепатита В в сыворотке (плазме) крови
(Гепабест анти-НВс-IgG)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к core-антигену вируса гепатита В в сыворотке (плазме) крови «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 рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Для исследования небольшой партии проб возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на двухстадийном твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантного core-антигена вируса гепатита В (НВсAg).

Во время первой инкубации происходит связывание содержащихся в анализируемом образце специфических антител к НВсAg с НВсAg, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок планшета.

Во время второй инкубации связавшиеся антитела 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. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к НВсAg в анализируемом образце.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым и зав. лабораторией И.Н. Кувишиновой

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок рекомбинантным НВсAg, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgG к НВсAg, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к НВсAg, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат – моноклональные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (12 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Принадлежности:

- пленки для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночки для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для дозаторов на 2-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G к НВсAg – соответствие результатов определения набором IgG к НВсAg требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-603), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с положительными сыворотками $ОП_{№1-№8} \geq ОП_{крит.}$

3.2. Специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к НВсAg – соответствие результатов определения набором IgG к НВсAg требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-603), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательными сыворотками $ОП_{№9-№24} < ОП_{крит.}$

3.3. Диагностическая чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G к НВсAg: клинические испытания, проведенные на 275 положительных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 200 пациентов, показали 100% чувствительность (интервал

98,5%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.4. Диагностическая специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к HBsAg: клинические испытания, проведенные на 278 отрицательных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 203 пациентов, показали 100% специфичность (интервал 98,5%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

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 поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г и в методических указаниях МУ 287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998 г).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

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

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших 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, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;

- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5-5000 мкл (погрешность не более 5%);
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- фильтровальная бумага;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать мутную, гемолизованную сыворотку крови.

6.2. Для проведения анализа можно использовать образцы плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия, гепарина или ЭДТА.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$ не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20 $^\circ\text{C}$ (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.

6.4. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 $^\circ\text{C}$.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °С не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое 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.

Хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
1	2,0	До 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.4. Подготовка положительного и отрицательного контрольных образцов.

Положительный и отрицательный контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) отобрать в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Конъюгат после первого вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) отобрать в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ.

Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным ТМБ).

Раствор ТМБ после первого вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.7. Стоп-реагент готов к использованию.

Стоп-реагент после первого вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. В лунки А-1, В-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-).

В лунку С-1 внести 100 мкл положительного контрольного образца (K^+).

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл цельных исследуемых образцов, тщательно перемешать, при этом цвет раствора меняется с фиолетового на синий. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 10 раз.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок планшета.

8.2. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфи-

цирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3), 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.

8.5. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

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

8.6. По окончании инкубации промыть планшет как описано в п. 8.3.

8.7. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

Планшет выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 $^\circ\text{C}$.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.8. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

8.9. Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Допускается измерение без использования референс-фильтра.

В случае необходимости оценки результатов по коэффициенту позитивности провести повторное измерение ОП в режиме: основной фильтр – 405 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение без использования референс-фильтра.

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.2. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($\text{ОП}_{\text{крит.}}$) по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит.}} = \text{ОП}_{\text{ср.}} \cdot K^- + 0,3$$

где: $\text{ОП}_{\text{ср.}} \cdot K^-$ — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом, измеренное в двухволновом режиме 450/620-655 нм

(или только с фильтром 450 нм).

9.3. Оценка результатов:

– среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,20 ед. опт. плотн.

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 1,0 ед. опт. плотн.

9.4. Только при соблюдении положений п. 9.3 можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

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

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

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток; раствор тетраметилбензидина; контрольные образцы; конъюгат и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

10.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, раствор ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

10.6. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «ГепатБест анти-НВс-IgG», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 227-75-40.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Зав. лабораторией маркеров
вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

И.Н. Кувшинова

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор
м.п.



Т.И. Поспелова



Проинформировано, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

 Захарова Л.Н.
"28" декабря 2017 г. 

