

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного подтверждения наличия HBsAg (Вектоген В-HBs-антиген-подтверждающий тест)

Комплект 1

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор «Вектоген В-HBs-антиген-подтверждающий тест» предназначен для иммуноферментного подтверждения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке (плазме) крови, препаратах крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин).

1.2. Комплект 1 набора рассчитан на проведение 48 анализов, включая контроли. Для исследования небольшой партии проб возможны 6 независимых постановок ИФА по 8 анализов, включая контрольные. Возможно использование набора в автоматических ИФА-анализаторах открытого типа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип метода заключается в проведении реакции нейтрализации (конкурентный ИФА) HBsAg в исследуемом образце с помощью поликлональных антител, содержащихся в растворе подтверждающего агента.

Первично положительные образцы исследуются с использованием нейтрализующих поликлональных антител в наборе «Вектоген В-HBs-антиген-подтверждающий тест». Поликлональные антитела в растворе подтверждающего агента реагируют с антигенными детерминантами HBsAg, препятствуя связыванию антигена с антителами на твердой фазе и в составе конъюгата. При наличии в образце HBsAg наблюдается не менее чем 50% снижение значения оптической плотности в конкурентном ИФА по сравнению со значе-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и начальником отделения Нетесовой И.Г.

нием в прямом ИФА, в котором вместо нейтрализующих антител добавляется раствор для разведения образца. При исследовании ложноположительных образцов не наблюдается 50% снижения оптической плотности в конкурентном ИФА по сравнению с сигналом в прямом ИФА.

2.2. Состав набора:

- планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к HBsAg – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), инактивированный, содержит $4,0 \pm 2,0$ МЕ/мл HBsAg – 1 фл., 1,5 мл;
- слабopоложительный контрольный образец ($K^+_{\text{слаб}}$), инактивированный, содержит $0,2 \pm 0,1$ МЕ/мл HBsAg – 1 фл. 1,5 мл;
- отрицательный контрольный образец (K^-), инактивированный – 1 фл., 2,5 мл;
- конъюгат, концентрат – поликлональные антитела к HBsAg, меченые пероксидазой хрена – 1 фл., 0,7 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – 1 фл., 7,0 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28,0 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- раствор подтверждающего агента (РПА) – 1 фл., 0,8 мл;
- раствор для разведения образцов (РРО) – 1 фл., 21,0 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13,0 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12,0 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 4-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность контролируется по разведениям стандартного образца предприятия, содержащего HBsAg субтипов ad и ay (СОП HBsAg ad, ay; рег. № 05-2-520). Растворы СОП HBsAg ad, ay с концентрацией HBsAg 0,05 МЕ/мл и ед. П-Э/мл (процедура 1) и 0,01 МЕ/мл и ед. П-Э/мл (процедура 2) должны интерпретироваться как положительные, т.е. содержащие HBsAg.

3.2. Специфичность контролируется по стандартной панели предприятия образцов сывороток крови, не содержащих HBsAg (СПП, рег. № 05-2-527), и составляет 100%. Все сыворотки СПП (100%) должны интерпретироваться как отрицательные, т.е. не содержащие HBsAg.

3.3. Диагностическая чувствительность: клинические испытания, проведенные на 284 положительных образцах сывороток и плазм крови от 259 больных гепатитом В в острой и хронической формах, показали 100 % чувствительность (интервал 98,9% - 100% с доверительной вероятностью 90%);

3.4. Диагностическая специфичность: клинические испытания, проведенные на 254 отрицательных образцах сывороток и плазм крови от 229 условно здоровых доноров крови, больных с другими инфекционными заболеваниями (больные гепатитом С, гепатитом А, ВИЧ-инфицированные пациенты), пациентов с положительным ревматоидным фактором, беременных и многорожавших женщин, показали 100% специфичность (интервал 98,7% - 100% с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе с исследуемыми и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113 от 30.12.98.

- 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

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 при одной длине волны – 450 нм;

- автоматический промыватель для планшетов;
- холодильник бытовой;
- термостатируемый шейкер орбитального типа на 400–800 об/мин, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 10 до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- перчатки медицинские диагностические одноразовые (ГОСТ Р 52239-2004);
- бумага фильтровальная лабораторная (ГОСТ 12026-76);
- цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл (ГОСТ 1770-74);
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);
- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа использовать образцы сыворотки и плазмы (полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия, гепарина или ЭДТА). Допускается использование образцов, хранившихся при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ не более 5 суток, либо при температуре минус $(20 \pm 4)^\circ\text{C}$, если необходимо более длительное хранение (допускается однократное замораживание/размораживание).

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать в течение 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

Ллиофильно высушенные препараты крови перед исследованием растворить в соответствии с инструкцией по применению данного препарата. Жидкие препараты крови исследовать неразведенными.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25) °С.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник при температуре (2–8) °С.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина в рабочем разведении.

При промывке лунки стрипов заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через край лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 с.

При использовании автоматического промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета 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, стоп-реагент, СБР, концентрат ТМБ), которые взаимозаменяемы в наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Наконечники для пипеток (автоматических дозаторов) следует использовать однократно.

Посуду (ванночки), используемые для работы с конъюгатом и тетраметилбензидином в рабочем разведении, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата в рабочем разведении промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки) для тетраметилбензидина в рабочем разведении сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказы-

вающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов (МУ-287-113 от 30.12.98).

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов.

7.2.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с 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 ФСБ-Т×25 (см. таблицу расхода реагентов) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

Хранение: промывочный раствор хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или при температуре (18-25) °С не более 7 дней.

7.2.2. Раствор конъюгата в рабочем разведении

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые наконечники для пипеток.

В соответствии с числом стрипов (см. таблицу расхода реагентов) в пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрата конъюгата и добавить соответствующее количество раствора для разведения конъюгата (РК), тщательно перемешать.

Хранение: раствор конъюгата в рабочем разведении стабилен в течение 1 мес. при температуре (2-8) °С.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов					
	2	4	6	8	10	12
Промывочный раствор						
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12
Дистиллированная вода, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300
Раствор конъюгата в рабочем разведении						
Конъюгат (концентрат), мкл	100	200	300	400	500	600
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
Раствор ТМБ в рабочем разведении						
ТМБ (концентрат), мкл	100	200	300	400	500	600
СБР, мл	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0

7.2.3. Раствор ТМБ в рабочем разведении

Внимание! Раствор ТМБ в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Для работы с раствором ТМБ использовать одноразовые наконечники для пипеток.

В пластиковую ванночку отобрать необходимое количество концентрата ТМБ и добавить требуемое количество СБР (см. таблицу расхода реагентов), тщательно перемешать пипетированием.

Хранение: Раствор ТМБ в рабочем разведении стабилен до 10 ч в защищенном от прямого солнечного света месте при температуре (18-25) °С.

7.3. Проведение анализа

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в целфленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застежкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при температуре (2–8) °С в течение 12 месяцев.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.2.1), раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.2), раствор ТМБ в рабочем разведении (п. 7.2.3).

7.3.2. Во все лунки стрипов для прямого ИФА внести по 10 мкл раствора для разведения образца (РРО), а во все лунки стрипа для конкурентного ИФА — по 10 мкл раствора подтверждающего агента (РПА).

Контрольные и исследуемые образцы по 100 мкл внести попарно в лунки стрипов прямого и конкурентного ИФА. Например, в лунки А-1 и А-2 внести по 100 мкл K^+ , в лунки В-1 и В-2 внести по 100 мкл $K^+_{слаб}$, в лунки С-1, С-2, D-1 и D-2 – по 100 мкл K^- . В остальные лунки внести попарно по 100 мкл исследуемых образцов.

7.3.3. Во все лунки внести по 50 мкл приготовленного раствора конъюгата.

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

7.3.4. Планшет заклеить пленкой и инкубировать, используя по выбору какой-либо из следующих режимов:

процедура 1 — 44°C 1 час, шейкер, 500 об/мин;

процедура 2 — 37°C 3 часа, шейкер, 500 об/мин.

7.3.5. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть планшет 5 раз промывочным раствором.

Внимание! Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (400 мкл промывочного раствора в режиме overflow – избыточной промывки). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Использовать крестообразное отсасывание жидкости из лунок, чтобы остаточный объём не превышал 10 мкл. Если остаточный объём в лунке больше 10 мкл, удалить влагу из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге.

7.3.6. Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ в рабочем разведении.

Внимание! Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, прилагаемые к набору.

Планшет поместить в защищенное от прямого солнечного света место на 25 мин при температуре (18-25) °С или на 20 мин при 37 °С.

7.3.7. Непосредственно перед внесением стоп-реагента измерить оптическую плотность, используя фильтр 450 нм.

Это вспомогательное измерение ОП, которое необходимо для анализа образцов, с ОП больше 2,0 о. е. в прямом и конкурентном ИФА в основном измерении после добавления стоп-реагента.

Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин измерить оптическую плотность (ОП).

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА при основном измерении регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Допустима регистрация результатов и без референс-фильтра.

Результаты ИФА при вспомогательном измерении проводить с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Используя основное измерение, рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср}K^-$), в которые добавлены РРО и РПА.

9.2. Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} (K^-) + 0,04 \quad (1)$$

9.3. Вычислить % подавления положительного контрольного образца (K^+), слабоположительного контрольного образца ($K^+_{слаб}$) по формуле:

$$\% \text{ подавления} = \frac{ОП_{прям} - ОП_{конк.}}{ОП_{прям} - ОП_{ср. K^-}} \times 100\% \quad (2)$$

где: $ОП_{прям}$ – оптическая плотность положительных образцов в лунках для прямого ИФА,

$ОП_{конк.}$ – оптическая плотность положительных образцов в лунках для конкурентного ИФА.

9.4. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– 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;

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом в прямом ИФА $ОП (K^+_{прям})$ должно быть не менее 1,0 ед. опт. плотн; % подавления в конкурентном ИФА должен быть не менее 50%.

– значение оптической плотности в лунке со слабоположительным контрольным образцом в прямом ИФА $ОП (K^+_{слаб. прям})$ должно быть не менее $ОП_{крит}$; % подавления в конкурентном ИФА должен быть не менее 50%.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычислить % подавления анализируемых образцов согласно формуле (2) (см. п. 9.3).

Для образцов, у которых одновременно $ОП_{обр}$ в прямом и конкурентном ИФА > 2 о.е., а % подавления $< 50\%$, вычислить отношение П/К по вспомогательному измерению $ОП_{обр}$ (см. п. 7.3.7).

$$П/К = ОП_{обр} \text{ в прямом ИФА(П)} / ОП_{обр} \text{ в конкурентном ИФА(К)}$$

Если для такого образца отношение $П/К \geq 2$, подтверждение есть (образец содержит HBsAg). Если отношение $П/К < 2$, необходимо развести образец с помощью РРО последовательно 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:500000 и повторить анализ, чтобы достигнуть показателей $П/К \geq 2$ или % подавления $\geq 50\%$ (подтверждение) или $ОП$ разведенного образца $< ОП_{крит}$ в прямом ИФА (нет подтверждения).

Если $ОП$ образца ($ОП_{обр}$) в прямом ИФА превышает или равна $1,2 \times ОП_{крит}$, % подавления больше или равен 50%, подтверждение есть (образец содержит HBsAg).

В сомнительных случаях, когда $0,8 \times \text{ОП}_{\text{крит}} \leq \text{ОП}_{\text{обр}} < \text{ОП}_{\text{крит}}$, % подавления $\geq 50\%$, или $\text{ОП}_{\text{крит}} \leq \text{ОП}_{\text{обр}} < 1,2 \times \text{ОП}_{\text{крит}}$, но % подавления $< 50\%$, необходимо повторить анализ. В случае воспроизведения результатов считать, что подтверждения нет.

Если $0,8 \times \text{ОП}_{\text{крит}} \leq \text{ОП}_{\text{обр}} < \text{ОП}_{\text{крит}}$, % подавления $< 50\%$, подтверждения нет.

Если $\text{ОП}_{\text{обр}}$ в прямом ИФА меньше $0,8 \times \text{ОП}_{\text{крит}}$, то независимо от % подавления подтверждения нет (см. Таблицу).

Таблица

ОП _{обр} в прямом ИФА при основном измерении	% подавления при основном измерении	П/К при вспомогательном измерении	Интерпретация
$\text{ОП}_{\text{обр}} \geq 1,2 \times \text{ОП}_{\text{крит}}$	$\geq 50\%$	Не вычислять	подтверждение, образец положительный
$\text{ОП}_{\text{обр}} > 2 \text{ о.е.}$	$< 50\%$	$\text{П/К} \geq 2$	сомнительный, развести с помощью РРО в 100, 1000, 10000, 100000, 500000 раз и исследовать повторно
	$< 50\%$	$\text{П/К} < 2$	
$0,8 \times \text{ОП}_{\text{крит}} \leq \text{ОП}_{\text{обр}} < \text{ОП}_{\text{крит}}$	$\geq 50\%$	Не вычислять	сомнительный, исследовать повторно, при воспроизведении результата считать, что подтверждения нет
$\text{ОП}_{\text{крит}} \leq \text{ОП}_{\text{обр}} < 1,2 \times \text{ОП}_{\text{крит}}$	$< 50\%$		
$0,8 \times \text{ОП}_{\text{крит}} \leq \text{ОП}_{\text{обр}} < \text{ОП}_{\text{крит}}$	$< 50\%$	Не вычислять	нет подтверждения, образец отрицательный
$\text{ОП}_{\text{обр}} < 0,8 \times \text{ОП}_{\text{крит}}$	Любое значение	Не вычислять	нет подтверждения, образец отрицательный

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2-8) °С.

10.3. Срок годности набора реагентов – 24 месяца со дня выпуска.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение 12 месяцев после его вскрытия. В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2–8) °С в течение 12 месяцев;

– контрольные образцы, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор, раствор для разведения конъюгата, раствор подтверждающего агента, раствор для разведения образцов, концентрат конъюгата, концен-

трат тетраметилбензида и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) °С в течение 12 месяцев;

– промывочный раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или при температуре (18-25) °С не более 7 дней;

– раствор конъюгата в рабочем разведении можно хранить в течение 1 месяца при температуре (2-8) °С;

– раствор ТМБ в рабочем разведении можно хранить до 10 ч в защищенном от прямого солнечного света месте при температуре (18-25) °С.

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 «Вектоген В-НВs-антиген-подтверждающий тест», 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.

Нач. отделения ИФА гепатита В
ЗАО «Вектор-Бест»

И.Г. Нетесова

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Зам. директора по научной работе ГБУЗ МО
«Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского»
д.м.н., профессор

А.В. Молочков



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 11 листов.
Зав. лабораторией "СПИД" ГБУЗ МО
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского
Кудрявцева Е.Н.



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2015 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для иммуноферментного
подтверждения наличия HBsAg
(Вектогеп В-HBs-антиген-подтверждающий тест)**

Комплект 2

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор «Вектогеп В-HBs-антиген-подтверждающий тест» предназначен для иммуноферментного подтверждения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке (плазме) крови, препаратах крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин).

1.2. Комплект 2 набора рассчитан на проведение 100 анализов, включая контроли с использованием любого комплекта набора реагентов для выявления HBsAg «Вектогеп В-HBs-антиген». Возможно использование набора в автоматических ИФА-анализаторах открытого типа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип метода заключается в проведении реакции нейтрализации (конкурентный ИФА) HBsAg в исследуемом образце с помощью поликлональных антител, содержащихся в растворе подтверждающего агента.

Первично положительные образцы исследуются с использованием нейтрализующих поликлональных антител в наборе «Вектогеп В-HBs-антиген-подтверждающий тест». Поликлональные антитела в растворе подтверждающего агента реагируют с антигенными детерминантами HBsAg, препятствуя связыванию антигена с антителами на твердой фазе и в составе конъюгата. При наличии в образце HBsAg наблюдается не менее чем 50% снижение значения оптической плотности в конкурентном ИФА по сравнению со значе-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и начальником отделения Нетесовой И.Г.

нием в прямом ИФА, в котором вместо нейтрализующих антител добавляется раствор для разведения образца. При исследовании ложноположительных образцов не наблюдается 50% снижения оптической плотности в конкурентном ИФА по сравнению с сигналом в прямом ИФА.

2.2. Состав набора:

- раствор подтверждающего агента (РПА) – 2 фл., по 0,8 мл;
- раствор для разведения образцов (РРО) – 2 фл., по 21,0 мл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность контролируется по разведениям стандартного образца предприятия, содержащего HBsAg субтипов ad и ay (СОП HBsAg ad, ay; рег. № 05-2-520). Для комплекта 2 при его использовании с набором «Вектоген В-HBs-антиген»: растворы СОП HBsAg ad, ay с концентрацией HBsAg 0,05 МЕ/мл и ед. П-Э/мл (процедура 1) и 0,01 МЕ/мл и ед. П-Э/мл (процедура 2) должны интерпретироваться как положительные, т.е. содержащие HBsAg.

3.2. Специфичность контролируется по стандартной панели предприятия образцов сывороток крови, не содержащих HBsAg (СПП, рег. № 05-2-527), и составляет 100%. Для комплекта 2 при его использовании с набором «Вектоген В-HBs-антиген»: все сыворотки СПП (100%) должны интерпретироваться как отрицательные, т.е. не содержащие HBsAg.

3.3. Диагностическая чувствительность: клинические испытания, проведенные на 284 положительных образцах сывороток и плазм крови от 259 больных гепатитом В в острой и хронической формах, показали 100 % чувствительность (интервал 98,9% - 100% с доверительной вероятностью 90%);

3.4. Диагностическая специфичность: клинические испытания, проведенные на 254 отрицательных образцах сывороток и плазм крови от 229 условно здоровых доноров крови, больных с другими инфекционными заболеваниями (больные гепатитом С, гепатитом А, ВИЧ-инфицированные пациенты), пациентов с положительным ревматоидным фактором, беременных и многорожавших женщин, показали 100% специфичность (интервал 98,7% - 100% с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе с исследуемыми и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113 от 30.12.98.
- 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

- 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 при одной длине волны – 450 нм;
- автоматический промыватель для планшетов;
- холодильник бытовой;
- термостатируемый шейкер орбитального типа на 400–800 об/мин, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 10 до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- перчатки медицинские диагностические одноразовые (ГОСТ Р 52239-2004);
- бумага фильтровальная лабораторная (ГОСТ 12026-76);
- цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл (ГОСТ 1770-74);
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);

- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113;

- набор реагентов для иммуноферментного выявления HBsAg «Вектогеп В-HBs-антиген».

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа использовать образцы сыворотки и плазмы (полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия, гепарина или ЭДТА). Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2–8) °С не более 5 суток, либо при температуре минус (20 ± 4) °С, если необходимо более длительное хранение (допускается однократное замораживание/размораживание).

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать в течение 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

Лиофильно высушенные препараты крови перед исследованием растворить в соответствии с инструкцией по применению данного препарата. Жидкие препараты крови исследовать неразведенными.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Проведение анализа

7.1.1. Для проведения анализа необходим набор реагентов «Вектогеп В-HBs-антиген». Приготовить реагенты согласно инструкции по применению набора реагентов «Вектогеп В-HBs-антиген».

7.1.2. Во все лунки стрипов для прямого ИФА внести по 10 мкл раствора для разведения образца (РРО), а во все лунки стрипа для конкурентного ИФА — по 10 мкл раствора подтверждающего агента (РПА).

Контрольные и исследуемые образцы по 100 мкл внести попарно в лунки стрипов прямого и конкурентного ИФА. Например, в лунки А-1 и А-2 внести по 100 мкл K^+ , в лунки В-1 и В-2 внести по 100 мкл $K^+_{слаб}$, в лунки С-1, С-2, D-1 и D-2 – по 100 мкл K^- . В остальные лунки внести попарно по 100 мкл исследуемых образцов.

7.1.3. Далее действовать в соответствии с инструкцией по применению набора «Вектогеп В-HBs-антиген» до стадии внесения в лунки стоп-реагента.

7.1.4. Непосредственно перед внесением стоп-реагента измерить оптическую плотность, используя фильтр 450 нм.

Это вспомогательное измерение ОП, которое необходимо для анализа образцов, с ОП больше 2,0 о. е. в-прямом и конкурентном ИФА в основном измерении после добавления стоп-реагента.

Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин измерить оптическую плотность (ОП).

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА при основном измерении регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Допустима регистрация результатов и без референс-фильтра.

Результаты ИФА при вспомогательном измерении проводить с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Используя основное измерение, рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{cp}K^-$), в которые добавлены РРО и РПА.

9.2. Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{cp}(K^-) + 0,04 \quad (1)$$

9.3. Вычислить % подавления положительного контрольного образца (K^+), слабоположительного контрольного образца ($K^{+ слаб}$) по формуле:

$$\% \text{ подавления} = \frac{ОП_{прям} - ОП_{конк.}}{ОП_{прям} - ОП_{cp} K^-} \times 100\% \quad (2)$$

где: $ОП_{прям}$ – оптическая плотность положительных образцов в лунках для прямого ИФА,

$ОП_{конк}$ – оптическая плотность положительных образцов в лунках для конкурентного ИФА.

9.4. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

- 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;
- значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом в прямом ИФА ОП ($K^+_{прям}$) должно быть не менее 1,0 ед. опт. плотн; % подавления в конкурентном ИФА должен быть не менее 50%.
- значение оптической плотности в лунке со слабopоложительным контрольным образцом в прямом ИФА ОП ($K^+_{слаб. прям}$) должно быть не менее $ОП_{крит}$; % подавления в конкурентном ИФА должен быть не менее 50%.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычислить % подавления анализируемых образцов согласно формуле (2) (см. п. 9.3).

Для образцов, у которых одновременно $ОП_{обр}$ в прямом и конкурентном ИФА > 2 о.е., а % подавления $< 50\%$, вычислить отношение П/К по вспомогательному измерению $ОП_{обр}$ (см. п. 7.3.7).

$$П/К = ОП_{обр} \text{ в прямом ИФА(П)} / ОП_{обр} \text{ в конкурентном ИФА(К)}$$

Если для такого образца отношение $П/К \geq 2$, подтверждение есть (образец содержит HBsAg). Если отношение $П/К < 2$, необходимо развести образец с помощью РРО последовательно 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:500000 и повторить анализ, чтобы достигнуть показателей $П/К \geq 2$ или % подавления $\geq 50\%$ (подтверждение) или ОП разведенного образца $< ОП_{крит}$ в прямом ИФА (нет подтверждения).

Если ОП образца ($ОП_{обр}$) в прямом ИФА превышает или равна $1,2 \times ОП_{крит}$, % подавления больше или равен 50%, подтверждение есть (образец содержит HBsAg).

В сомнительных случаях, когда $0,8 \times ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$, % подавления $\geq 50\%$, или $ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < 1,2 \times ОП_{крит}$, но % подавления $< 50\%$, необходимо повторить анализ. В случае воспроизведения результатов считать, что подтверждения нет.

Если $0,8 \times ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$, % подавления $< 50\%$, подтверждения нет.

Если $ОП_{обр}$ в прямом ИФА меньше $0,8 \times ОП_{крит}$, то независимо от % подавления подтверждения нет (см. Таблицу).

Таблица

ОП _{обр} в прямом ИФА при основном измерении	% подавления при основном измерении	П/К при вспомогательном измерении	Интерпретация
$ОП_{обр} \geq 1,2 \times ОП_{крит}$	$\geq 50\%$	Не вычислять	подтверждение, образец положительный
$ОП_{обр} > 2$ о.е.	$< 50\%$	$П/К \geq 2$	
	$< 50\%$	$П/К < 2$	сомнительный, развести с помощью РРО в 100, 1000, 10000, 100000, 500000 раз и исследовать повторно
$0,8 \times ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$	$\geq 50\%$	Не вычислять	сомнительный, исследовать повторно, при воспроизведении результата считать, что подтверждения нет
$ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < 1,2 \times ОП_{крит}$	$< 50\%$		
$0,8 \times ОП_{крит} \leq ОП_{обр} < ОП_{крит}$	$< 50\%$	Не вычислять	нет подтверждения, образец отрицательный
$ОП_{обр} < 0,8 \times ОП_{крит}$	Любое значение	Не вычислять	нет подтверждения, образец отрицательный

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться всеми видами крытого транспорта при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2-8) °С.

10.3. Срок годности набора реагентов – 24 месяца со дня выпуска.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение 12 месяцев после его вскрытия. В случае дробного использования набора:

– раствор подтверждающего агента и раствор для разведения образцов после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение 12 месяцев.

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 **«Вектоген В-НВs-антиген-подтверждающий тест»**, 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.

Нач. отделения ИФА гепатита В
ЗАО «Вектор-Бест»

И.Г. Нетесова

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Зам. директора по научной работе ГБУЗ МО
«Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского»
д.м.н., профессор



А.В. Молочков

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью _____ листов.
Зав. лабораторией "ЦИРМИ" ФБУЗ МО
МОНИКИ им. Л.П. Эрлиха Минздрава России
_____ Кудрявцева Е.Н.

