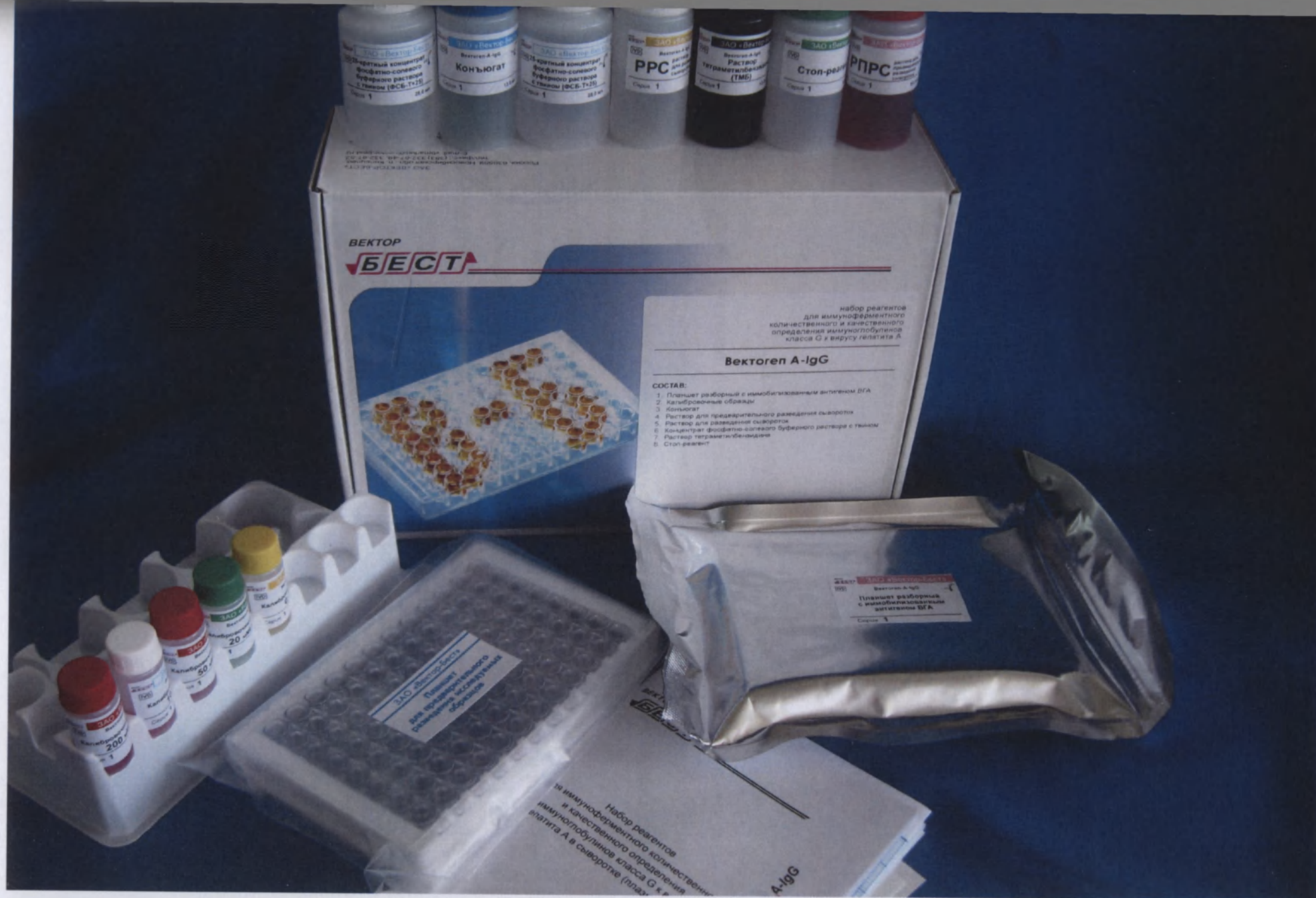




18/02

ТВЕРЖДЕНА

приказом Росздравнадзора

_____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

_____ М.Д. Хусаинов

« 13 » _____ 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

по применению набора реагентов для иммуноферментного
количественного и качественного определения иммуноглобулинов
класса G к вирусу гепатита А в сыворотке (плазме) крови
«Вектогеп А-IgG»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Вектогеп А-IgG» (далее по тексту – набор) предназначен для количественного и качественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита А (IgG к ВГА) в сыворотке (плазме) крови человека и в препаратах крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях для диагностики гепатита А, для проведения предвакцинального скрининга и контроля эффективности вакцинации против вируса гепатита А.

1.3. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные образцы. Для исследования небольших партий проб возможны 4 независимые постановки ИФА по 24 анализа каждая, включая контрольные образцы (количественный вариант) либо 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контрольные образцы (качественный вариант).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения антител к ВГА основан на двухстадийном твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации происходит связывание специфических антител, содержащихся в исследуемых образцах, с иммобилизованным на поверхности лунок

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией НИИ СД И.Н. Кузиной и в.н.с. НИИ СД И. Ливицкой.

стрипов антигенами ВГА с образованием комплекса «антиген-антитело». На второй стадии связавшиеся IgG к ВГА взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител против IgG человека с пероксидазой хрена.

Комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Степень окраски пропорциональна концентрации специфических антител в анализируемых образцах.

Концентрацию антител к ВГА в анализируемых образцах сывороток определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания IgG к ВГА в калибровочных образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном ВГА, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочный образец, не содержащий IgG к ВГА: 0 мМЕ/мл, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- калибровочные образцы, содержащие IgG к ВГА 50 мМЕ/мл; 100 мМЕ/мл; 200 мМЕ/мл – готовые для использования – 3 флакона (по 1,5 мл);
- калибровочный образец, содержащий IgG к ВГА 20 мМЕ/мл, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител против IgG человека, меченных пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 флакона (по 28,0 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночкой для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 4 – 200 мкл – 16 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

– планшет для предварительного разведения исследуемых образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфическая активность.

3.1.1. Специфичность: по результатам анализа сывороток стандартной панели предприятия, не содержащих IgG к ВГА (рег. № 05-2-206), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», составляет 100%.

3.1.2. Чувствительность: по результатам анализа сывороток стандартной панели предприятия, содержащих IgG к ВГА (рег. № 05-2-206), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», оставляет 100%.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации по результатам определения содержания IgG к ВГА в одном и том же образце с использованием набора Вектогеп А-IgG не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации IgG к ВГА в образцах при их разведении имеет линейный характер в диапазоне концентраций от 20 до 200 мМЕ/мл и составляет 90-100%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» IgG к ВГА - соответствие измеренной концентрации IgG к ВГА предписанной в образце, полученном путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 20 мМЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Аналитическая чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация IgG к ВГА не превышает 1,0 мМЕ/мл.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (ГОСТ Р 51609-2000).

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 клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113 (утвержденных Департаментом госсанэпиднадзора Мин-

здрава 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.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

Для работы с набором необходимо следующее дополнительное оборудование и материалы:

спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 405 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм;

термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °C;

холодильник бытовой;

дозаторы полуавтоматические одноканальные и многоканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;

промывочное устройство для планшетов;

флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

перчатки резиновые хирургические;

цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100, 1000 мл;

вода дистиллированная;

дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 сут или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

6.3. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре от 18 до 25 °C не менее 60 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок;

Оставшиеся неиспользованными стрипы хранить при от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.3. Подготовка калибровочных образцов

Калибровочные образцы готовы к использованию.

Перед проведением анализа флаконы с калибровочными образцами встряхнуть.

Калибровочные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.4. Предварительное разведение исследуемых образцов.

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать. При разведении сыворотки красный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет образца меняется незначительно.

Хранить не более 3 ч при температуре от 18 до 25 °C.

7.5. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30-40 °C до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °C : более 5 сут.

Таблица

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистилли- рованная вода, мл		
1	2	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

7.6. Подготовка конъюгата.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) тобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количест- о конъюгата.

Конъюгат хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) тобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количест- о раствора ТМБ.

Раствор ТМБ хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.8. Внесение контрольных и исследуемых образцов.

Для постановки **качественного** варианта анализа в лунку А-1 внести 100 мкл калибровочного образца 0 мМЕ/мл, в лунки В-1, С-1 – по 100 мкл калибровочного образца 20 мМЕ/мл, в лунку D-1-100 мкл калибровочного образца 200 мМЕ/мл.

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов.

Для постановки **количественного** варианта анализа внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 100 мкл калибровочных образцов 0; 20; 50; 100; 200 мМЕ/мл.

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов в дублях.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение 15-20 мин.

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 7°C.

7.10. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.5) перед аспирацией и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. При этом в каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе одного промывания.

Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см п. 7.6).

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

7.12. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37°C.

7.13. По окончании инкубации промыть планшет 5 раз как описано выше (см. п. 7.10).

7.14. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ (см. п. 7.7) и инкубировать в темноте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °C.

Для внесения раствора ТМБ использовать ванночку для реагента и одноразовые накопечники, входящие в состав набора.

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить оптическую плотность в лунках с помощью спектрофотометра: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение оптической плотности на одной длине волны – 450 нм.

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Качественное определение IgG к ВГА.

9.1.1. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

– $B_0 \leq 0,1$ ед. опт. плотн., где B_0 – значение оптической плотности в лунке с калибровочным образцом 0 мМЕ/мл;

– $B_{200} \geq 2,0$ ед. опт. плотн., где B_{200} – значение оптической плотности в лунке с калибровочным образцом 200 мМЕ/мл;

9.1.2. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с калибровочным образцом 20 мМЕ/мл ($ОП_{20}$).

Результат анализа считают **положительным**, если значение ОП анализируемого образца равно или превышает величину $ОП_{20}$.

Результат анализа считают **отрицательным**, если значение ОП анализируемого образца ниже $ОП_{20}$.

9.2. Количественное определение IgG к ВГА.

9.2.1. Вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с калибровочными образцами. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации IgG к ВГА в калибровочных образцах (мМЕ/мл).

9.2.2. Определить содержание IgG к ВГА в анализируемых образцах по калибровочному графику. Полученную концентрацию IgG к ВГА умножить на фактор разведения.

9.2.3. Если значение ОП анализируемого образца превышает ОП калибровочного образца 200 мМЕ/мл, следует повторить анализ, разведя образец в 10 раз.

Для этого в лунке планшета для предварительного разведения образцов к 90 мкл РПРС добавить 10 мкл анализируемой сыворотки, тщательно перемешать (разведение 1:10). Затем к 90 мкл РРС добавить 10 мкл разведенной 1:10 сыворотки, тщательно перемешать (разведение 1:100). Далее, согласно п. 7.8 данной инструкции, в лунку планшета с иммобили-

ванным антигеном ВГА внести 90 мкл РРС и 10 мкл разведенной 1:100 сыворотки. Таким образом, исследуемая сыворотка разбавляется в лунке в 1000 раз.

Если при разведении в 1000 раз ОП сыворотки вновь превышает концентрацию калибровочного образца 200 мМЕ/мл, то необходимо исследовать данный образец повторно в разведениях 1:10 000, 1:100 000 и т.д.

При подсчете концентрации необходимо учесть фактор разведения, т.е. умножить полученный результат на соответствующий коэффициент.

9.2.4. Если концентрация IgG к ВГА в анализируемом образце менее 20 мМЕ/мл, результат оценивают как **отрицательный**.

Если концентрация IgG к ВГА в анализируемом образце 20 мМЕ/мл и более, результат оценивают как **положительный**. Содержание в сыворотке IgG к ВГА в концентрации 20 мМЕ/мл и более обеспечивает защитный эффект от заражения ВГА.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование наборов должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов «Вектогеп А-IgG» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. 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 и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- раствор тетраметилбензидина после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- калибровочные образцы, конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– раствор для предварительного разведения сывороток, раствор для разведения сывороток 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;

10.4. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

10.5. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более суток или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес, допускается однократное амораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

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

10.7. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Г×25, стоп-реагент, раствор для предварительного разведения сывороток), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «Вектогеп А-IgG», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 363-13-46, 227-75-40, тел./факс (383) 363-20-60.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Ведущий научный сотрудник НИИСД
ЗАО «Вектор-Бест»

Н.И. Ливицкая

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

Начальник управления по науке,
инновациям и информатизации
ГБОУ ВПО НГМУ
Минздравсоцразвития России



М.Ф. Осипенко



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

двенадцать листов

Handwritten signature