

Копия верна



УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы по надзору
в сфере здравоохранения и
социального развития

Р.У. Хабриев

«15» 12 2006 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

«Вектоген А – IgM-стрип»

набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита А

Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита А представляет собой диагностический набор для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе.

СОСТАВ НАБОРА

- иммуносорбент – моноклональные антитела против иммуноглобулинов класса М человека, иммобилизованные на 96 луночном разборном планшете;
- положительный контрольный образец (K^+), инаktivированный – прозрачная жидкость красного цвета;
- отрицательный контрольный образец (K^-), инаktivированный – прозрачная бесцветная или слегка желтоватого цвета жидкость с легкой опалесценцией;
- антиген ВГА, инаktivированный – бесцветная жидкость с легкой опалесценцией;
- конъюгат, концентрат (моноклональные антитела к ВГА, меченные пероксидазой хрена) – прозрачная жидкость синего цвета;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – жидкость малинового цвета;

Взамен инструкции по применению, утвержденной 02.02.2001 г.

- раствор для разведения сывороток (PPC) – прозрачная бесцветная жидкость с легкой опалесценцией;
- раствор для разведения конъюгата (PPK) – прозрачная бесцветная жидкость с легкой опалесценцией;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – прозрачная бесцветная жидкость, возможно выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре от 30 до 40 °С в течение 20 мин;
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – прозрачная бесцветная жидкость;
- субстратный буферный раствор (СБР) – прозрачная бесцветная жидкость;
- стоп-реагент – прозрачная бесцветная жидкость.

Активными компонентами тест-системы являются моноклональные антитела против иммуноглобулинов класса М человека, иммобилизованные в лунках планшетов, конъюгат моноклональных антител к ВГА с пероксидазой хрена, антиген ВГА, положительный и отрицательный контрольные образцы.

В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца во время первой инкубации происходит связывание специфических иммуноглобулинов класса М к ВГА с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами против иммуноглобулинов класса М человека.

Во время второй инкубации, связавшиеся иммуноглобулины класса М к ВГА, взаимодействуют с добавленным в лунки комплексом антигена ВГА и моноклональных антител к антигену ВГА, конъюгированных с пероксидазой.

После удаления избытка несвязавшегося комплекса, во время инкубации с раствором ТМБ, происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации иммуноглобулинов класса М к ВГА в анализируемых пробах.

Тест-система рассчитана на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контроли.

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для выявления иммуноглобулинов класса М к ВГА в сыворотке крови человека и может быть использована с целью ранней дифференциаль-

1

ной диагностики гепатита А в клинических и эпидемиологических исследованиях, а также для отбраковки донорских сывороток.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Образцы крови у обследуемых лиц в количестве не менее 0,5 мл отбирают из вены или из пальца натошак. Сыворотку крови тщательно отделяют от сгустка и примеси эритроцитов.

Для постановки реакции возможно использование свежеприготовленной сыворотки, так и хранившейся при температуре от 2 до 8 °С в течение 24 ч, либо при температуре минус 20 °С в течение 3 мес.

Не допускается повторное замораживание – размораживание образцов.

При постановке ИФА следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.

Для повышения чувствительности анализа и сокращения времени реакции рекомендуется проводить инкубацию на термошейкере типа PST-60HL при перемешивании 500–800 об./мин.

Для успешного использования набора необходимо полное понимание вложенной инструкции. Достоверные результаты будут получены только при использовании точной лабораторной техники и аккуратном следовании инструкции.

Перед использованием набора необходимо прогреть все реагенты до комнатной температуры (18-25 °С).

Не использовать реагенты из других наборов, реагенты с истекшим сроком хранения.

Необходимо избегать загрязнения компонентов тест-системы микроорганизмами и химическими примесями, для этого используют в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца. После отбора необходимого количества компонента флаконы плотно закрывают и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 4 недель.

Вскрывать цelloфановый пакет с планшетом следует со стороны зажима, отступив выше него примерно 1 см. Неиспользованные стрипы необходимо обратно поместить в пакет с осушителем, закрыть пластиковой застежкой и хранить не более 4 недель при температуре от 2 до 8 °С.

а

При многократном использовании контейнера или ванночки для компонента их следует использовать всегда для одного и того же реагента, при повторном применении следует тщательно промыть дистиллированной водой до и после каждого использования.

Для работы с набором необходимо использовать дистиллированную воду, так как компоненты набора очень чувствительны к микробиологическому загрязнению, хлорноватистой кислоте и ароматическим хлорсоединениям, ионам металлов, зачастую находящихся в воде.

1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ И РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИФА

1.1 Контрольные образцы

Контрольные образцы K^+ и K^- готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Хранение: после первого вскрытия флаконы хранят в течение 4 недель при температуре от 2 до 8 °C.

1.2 Исследуемые образцы

Подготовку исследуемых образцов проводят непосредственно перед постановкой анализа.

Исследуемые образцы сывороток разводят в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РПРС). Для этого используют вспомогательный ряд пробирок или вспомогательный планшет. К 90 мкл РПРС добавляют 10 мкл цельной сыворотки, тщательно перемешивают пипетированием. При этом цвет раствора должен измениться с малинового на жёлтый.

Внимание! Разведенную сыворотку не хранить!

1.3 Рабочий раствор ФСБ-Т (ФСБ-Т однократный)

Рабочий раствор ФСБ-Т (для промывания планшета) готовят из концентрата ФСБ-Т×25.

Перед использованием флакон с концентратом ФСБ-Т×25 встряхивают. При обнаружении осадка солей в концентрате его прогревают при температуре от 30 до 40 °C до полного растворения осадка.

28 мл концентрата ФСБ-Т разводят дистиллированной водой до 700 мл.

Хранение: до 4 недель при температуре от 2 до 8 °C.

1.4 Приготовление рабочего раствора смеси антигена ВГА и конъюгата

Готовят за 20 мин до окончания первой инкубации!

Количество рабочего раствора смеси антигена ВГА и конъюгата, необходимое для данной постановки анализа, определяют, в зависимости от числа используемых стрипов, по таблице расхода компонентов тест-системы (см. ниже)

В отдельный чистый флакон (пластиковую емкость) вносят необходимое количество раствора для разведения конъюгата (РРК), добавляют соответствующее количество концентрата конъюгата и антигена ВГА (см. таблицу расхода компонентов) и тщательно перемешивают.

Хранение: до 24 ч при температуре от 2 до 8 °.

1.5 Раствор ТМБ

Готовят непосредственно перед использованием. При приготовлении раствора ТМБ следует исключить воздействие света, например, обернуть флакон фольгой.

Количество раствора ТМБ, необходимое для данной постановки анализа, определяют, в зависимости от числа используемых стрипов, по таблице расхода компонентов тест-системы (см. ниже).

В отдельный чистый флакон вносят необходимое количество СБР, добавляют нужное количество концентрата ТМБ и тщательно перемешивают. Приготовленный раствор ТМБ должен быть прозрачным и бесцветным.

Хранение: до 20 мин при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

Таблица расхода компонентов тест-системы

Количество одновременно используемых стрипов	Концентрат конъюгата, мкл	Антиген ВГА, мл	РРК, мл	Концентрат ТМБ, мкл	СБР, мл
1	80	0,1	0,7	70	1,0
2	160	0,2	1,4	140	2,0
3	240	0,3	2,1	210	3,0
4	320	0,4	2,8	280	4,0
5	400	0,5	3,5	350	5,0
6	480	0,6	4,2	420	6,0
7	560	0,7	4,9	490	7,0
8	640	0,8	5,6	560	8,0
9	720	0,9	6,3	630	9,0
10	800	1,0	7,0	700	10,0
11	880	1,1	7,7	770	11,0
12	960	1,2	8,4	840	12,0

a

Внимание! В состав набора входят кювета и наконечники для пипетки, которые следует использовать только для работы с раствором ТМБ. Посуду и пипетки (наконечники), контактирующие с раствором ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

2. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

2.1 Подготовка стрипов

Перед вскрытием упаковки планшет следует выдержать в течение 30 мин при температуре от 18 до 25 °С. Стрипы, в количестве, необходимом для проведения анализа, закрепляют в рамке планшета, остальные – немедленно вновь плотно закрывают в исходной упаковке. Стрипы хранят после первого вскрытия целлофанового пакета в течение 4 недель в условиях хранения при температуре от 2 до 8 °С.

2.2 Внесение контрольных и исследуемых образцов

В две лунки стрипа А-1 и В-1 вносят по 100 мкл K^- . В лунку С-1 – 100 мкл K^+ .

В остальные лунки вносят по 90 мкл раствора для разведения сывороток (РРС) и по 10 мкл предварительно подготовленных сывороток (п. 1.2). Для повышения достоверности результатов анализа каждый образец вносят в повторах. Пробы тщательно перемешивают. Таким образом, исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 100 раз.

2.3 Проведение инкубации

Планшет закрывают плёнкой и инкубируют в течение 60 мин при температуре 37 °С или 30 мин при 37 °С на термошейкере с интенсивностью перемешивания 500-800 об/мин. За 20 мин до окончания инкубации готовят смесь антигена ВГА и конъюгата (п. 1.4).

2.4 Промывание планшета

Содержимое лунок удаляют в сосуд с дезинфицирующим раствором (6% раствор перекиси водорода) с помощью промывателя или многоканальной пипетки. После чего наконечники пипетки обязательно меняют на новые. Планшет промывают 5-6 раз дистиллированной водой, добавляя в каждую лунку не менее 250 мкл жидкости. Остатки влаги удаляют, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

2.5 Внесение антигена ВГА и конъюгата

Во все лунки планшета вносят по 100 мкл смеси антигена ВГА и конъюгата (п. 1.4).

2.6 Проведение инкубации

Планшет закрывают плёнкой и инкубируют в течение 90 мин при температуре 37 °С или 60 мин при 37 °С на термошейкере с интенсивностью перемешивания 500-800 об/мин. За 10 мин до окончания инкубации готовят раствор ТМБ (п. 1.5).

2.7 Промывание планшета

Содержимое лунок удаляют в сосуд с дезинфицирующим раствором, лунки промывают 5 раз однократным ФСБ-Т (п. 1.3), соблюдая этапы промывки (п. 2.4). В процессе промывки обязательно выдержать лунки с промывочным раствором 30 сек.

2.8 Внесение раствора ТМБ

Во все лунки вносят по 100 мкл свежеприготовленного раствора ТМБ. Планшет закрывают плёнкой и выдерживают в защищённом от света месте при температуре от 20 до 25 °С 20 мин.

2.9 Внесение стоп-реагента

Ферментативную реакцию останавливают добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

Внимание! Избегайте контакта с раствором ТМБ и стоп-реагентом. В случае попадания раствора ТМБ или стоп-реагента на кожу и слизистые оболочки необходимо немедленно смыть их большим количеством проточной воды.

РЕГИСТРАЦИЯ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществляют по воздуху. Измерения проводят сразу же, не позднее 10-15 мин после остановки реакции.

Результаты исследований оценивают только в том случае, если среднее значение оптической плотности отрицательного контрольного образца (ОП К⁻) не превышает 0,2, а значение оптической плотности положительного контрольного образца (ОП К⁺) не менее 0,8.

Результат анализа считают положительным с ОП равной или превышающей критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит.}$), которое вычисляется по формуле: $ОП_{крит.} = ОП_{ср} \cdot K + 0,2$.

Для интерпретации результатов исследования рекомендуется использовать коэффициент позитивности (КП):

$$КП = \frac{ОП_{иссл. сыв.}}{ОП_{крит}}$$

Если $КП < 1$, результат оценивается как отрицательный.

Если $КП \geq 1$, исследуемая сыворотка расценивается как положительная.

Таблица интерпретации результатов серологических тестов

КП IgM к ВГА	Другие маркеры ВГА-инфекции		Возможные варианты определения стадии ВГА-инфекции
	В сыворотке	В фекалиях	
$1 \leq КП \leq 2,5$	IgG ВГА+	Ag ВГА–	Восстановительный период гепатита А (стадия выздоровления)
$1 \leq КП \leq 2,5$	IgG ВГА–	Ag ВГА+	Начало клинического периода гепатита А (стадия разгара болезни)
$1 \leq КП \leq 2,5$	IgG ВГА–	Ag ВГА–	Следует контролировать нарастание концентрации IgM; если увеличение содержания IgM имеется – это начало клинического периода гепатита А
$КП \geq 2,5$	IgG ВГА– или IgG ВГА+	Ag ВГА+ или Ag ВГА–	Стадия разгара болезни (клинический период гепатита А)

Положительные сыворотки, попавшие в зону $1 \leq КП \leq 2,5$, имеют низкие концентрации IgM к ВГА. Такое содержание IgM к ВГА может соответствовать началу инфекционного процесса, либо концу заболевания – восстановительному периоду гепатита А, когда в крови у обследуемого, кроме IgM, имеются в высокой концентрации IgG к ВГА.

В том случае, когда в исследуемой сыворотке содержание IgM к ВГА определяется в низкой концентрации, а IgG к ВГА отсутствуют, следует провести анализ парных сывороток на степень изменения концентрации IgM в 1-й и 2-й сыворотках больного, взятых с интервалом 7-14 дней. Парные сыворотки должны тестироваться в двух повторях во время одной постановки.

Увеличение КП для 2-го образца, взятого через 7-14 дней, в сравнении с КП 1-го образца, свидетельствует о возрастании концентрации IgM в сыворотке крови и указывает на начало инфекции ВГА.

Положительные образцы с КП $\geq 2,5$ имеют высокое содержание IgM к ВГА, обычно соответствующее клиническому периоду гепатита А (стадии разгара болезни).

ФОРМА ВЫПУСКА

Набор выпускают в виде комплекта реагентов, упакованном в коробку:

– иммуносорбент – планшет разборный, упакованный в пакет размером 115x150 мм из плёнки полиэтиленовой или из цефлена	1 шт.;	
– положительный контрольный образец (K^+)	1 флакон	1,5 мл;
– отрицательный контрольный образец (K^-)	1 флакон	2,5 мл;
– антиген ВГА	1 флакон	1,3 мл;
– конъюгат, концентрат	1 флакон	1,2 мл;
– раствор для предварительного разведения сывороток	1 флакон	10,0 мл;
– раствор для разведения сывороток	1 флакон	12,0 мл;
– раствор для разведения конъюгата	1 флакон	12,0 мл;
– фосфатно-солевой буферный раствор с твином, концентрат	1 флакон	28,0 мл;
– тетраметилбензидин, концентрат	1 флакон	1,0 мл;
– субстратный буферный раствор	1 флакон	13,0 мл;
– стоп-реагент	1 флакон	12,0 мл;
– инструкция по применению	1 шт.	

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности тест-системы – 6 месяцев. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Набор хранят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С в недоступном для детей месте. Замораживание не допускается.

Набор транспортируют в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С, допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С не более 3 суток. Замораживание не допускается.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество тест-системы направлять:

в Федеральное государственное учреждение науки «Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов (ФГУН ГИСК) им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу: 121002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел. (495) 241-39-22;

и в адрес предприятия-изготовителя ЗАО «Вектор-Бест»: 630559, Новосибирская обл., Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 336-60-60, тел./факс (383) 336-73-46, 336-60-30, E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов



Пропиновано, пронумеровано
и скреплено печатью
10 листов

А. (Гирришвили В.А.)