

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2007 г. № _____



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

_____ 2007 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита Е
(Вектогеп Е – IgM)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Вектогеп Е – IgM (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита Е в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Определение IgM к ВГЕ проводится методом иммуноферментного анализа.

В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца во время первой инкубации происходит связывание иммуноглобулинов класса М с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок рекомбинантными антигенами вируса гепатита Е.

Во время второй инкубации связавшиеся иммуноглобулины класса М к ВГЕ взаимодействуют с антителами против IgM человека, меченные пероксидазой хрена.

После удаления избытка несвязавшегося конъюгата, во время инкубации с раствором ТМБ, происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации иммуноглобулинов класса М к ВГЕ в анализируемых пробах. Учет результатов спектрофотометрический в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-

*Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД
М.Ю. Рукавишниковым, с.п.с. НИИ СД Н.И. Ливичкой*

фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок рекомбинантными антигенами вируса гепатита Е – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+), инактивированная сыворотка крови человека в разведении 1:100, содержащая IgM к вирусу гепатита Е (ВГЕ) – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-), инактивированная сыворотка крови человека в разведении 1:100, не содержащая IgM к ВГЕ – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат, концентрат – 1 флакон (1,5 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 2 флакона (по 28 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения сывороток – 1 флакон (12 мл);
- раствор для разведения конъюгата – 1 флакон (12 мл);
- субстратный буферный раствор – 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент – 1 флакон (12 мл).

Дополнительно в комплект поставки набора входят:

- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки на 4–200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность при проверке на отрицательных сыворотках СПП, не содержащих IgM к ВГЕ, должна быть 100 %. При этом:

- среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{cp} K^-$) $\leq 0,20$;
- среднее значение ОП в лунках с положительным контрольным образцом ($ОП_{cp} K^+$) $\geq 0,60$.

3.2. Чувствительность при проверке на положительных сыворотках СПП, содержащих IgM к ВГЕ, должна быть 100 %.

СПП – «Стандартная панель сывороток предприятия, содержащих и не содержащих IgM к вирусу гепатита Е» СПП (рег. № 27 от 19.01.05, аттестована ОБТК ЗАО «Вектор-Бест»).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000, Административный регламент Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по регистрации изделий медицинского назначения).

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

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

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

– Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: основной фильтр — 450 нм, референс-фильтр в диапазоне — 620 - 650 нм; или только с фильтром 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень (бланк) осуществлять по воздуху);

- термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °C;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;

- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;
- колба мерная вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- 6% раствор перекиси водорода.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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. Сыворотки хранят при температуре (2-8) °С в течение 48 ч, либо при температуре минус 20 °С не более 3 месяцев. Не рекомендуется проводить оттаивание и замораживание образцов более одного раза.

После размораживания образцы следует тщательно перемешать. Образцы, содержащие осадок, необходимо освободить от него центрифугированием при 5-10 тыс. об/мин в течение 10 мин.

Не допускается использование гемолизированных, мутных образцов сыворотки (плазмы) крови, образцов с признаками микробной контаминации.

Следует обратить внимание на точное дозирование и тщательное перемешивание сывороток с раствором, используемым для их разведения. От соблюдения этих требований зависит точность и воспроизводимость результатов анализа.

Для внесения реагентов в лунки стрипов используют пипеточные дозаторы с погрешностью измерения объемов не более 5%, для промывания лунок планшета можно использовать ручные, автоматические промыватели, а также восьми- или двенадцатиканальные пипеточные дозаторы.

Перед постановкой анализа компоненты набора и исследуемые образцы прогревают не менее 30 мин при температуре (18-25) °С.

7. ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

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

Не использовать компоненты набора после истечения срока их годности.

Для приготовления растворов использовать только чисто вымытую стеклянную или чистую одноразовую пластиковую посуду и наконечники для пипеток.

Для отбора исследуемых образцов и компонентов набора использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5 %.

Во избежание ложноположительных результатов, не допускать перекрестного загрязнения соседних лунок исследуемыми образцами. При отборе, разведении и внесении каждого образца использовать отдельный наконечник; для повышения точности разведения не погружать наконечник глубоко в исходный образец.

Не допускать контакта раствора конъюгата с металлическими предметами, пылью, растворами (и их парами) кислот, щелочей и альдегидов.

Во избежание контакта субстратов пероксидазы даже со следовыми количествами конъюгата, использовать для субстратного буферного раствора, концентрата тетраметилбензидина и рабочего раствора тетраметилбензидина только специально выделенные отдельные емкости.

Не допускать роста микроорганизмов в емкости для промывочного раствора и в соединительных шлангах. Для этого раз в неделю обрабатывать их 70 % этиловым спиртом.

Перед проведением ИФА дать растворам образцов и реагентов нагреться до комнатной (от 18 до 25°C) температуры.

При выполнении ИФА не изменять и тщательно выполнять протокол анализа.

Быстро вносить реагенты после промывки планшета, не допускать пересыхания лунок.

7.2. Приготовление реагентов

7.2.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при комнатной температуре не менее 1 ч.

7.2.2. Подготовка планшета.

Непосредственно перед использованием вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов; остальные стрипы снять с рамки и обратно поместить в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы после первого вскрытия пакета можно хранить при температуре (2-8) °C не более 4 недель.

7.2.3. Приготовление раствора для отмывки планшета.

Раствор для отмывки планшета приготовить разведением исходного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином в 25 раз. Необходимые для проведения анализа объемы концентрата и дистиллированной воды, в зависимости от числа используемых стрипов, определяют по таблице расхода компонентов. При выпадении осадка солей концентрат прогревают при температуре (30-40) °C до полного растворения осадка.

Приготовленный раствор для отмывки планшета можно хранить при температуре (2-8) °C не более 3 суток.

Таблица расхода компонентов

Количество используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Раствор для отмывки планшета	
	Конъюгат, концентрат, (мл)	Раствор для разведения конъюгата (мл)	Тетраметилбензидин, концентрат (мкл)	Субстратный буферный раствор (мл)	Фосфатно-солевой буферный раствор с твином, концентрат (мл)	Дистиллированная вода (мл)
1	0,1	1,0	70	1,0	2,0	До 50
2	0,2	2,0	140	2,0	4,0	До 100
3	0,3	3,0	210	3,0	6,0	До 150
4	0,4	4,0	280	4,0	8,0	До 200
5	0,5	5,0	350	5,0	10,0	До 250
6	0,6	6,0	420	6,0	12,0	До 300
7	0,7	7,0	490	7,0	14,0	До 350
8	0,8	8,0	560	8,0	16,0	До 400
9	0,9	9,0	630	9,0	18,0	До 450
10	1,0	10,0	700	10,0	20,0	До 500
11	1,1	11,0	770	11,0	22,0	До 550
12	1,2	12,0	840	12,0	24,0	До 600

7.2.4. Подготовка контрольных образцов.

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

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре (2-8) °C не более 4 недель.

7.2.5. Подготовка исследуемых образцов

Подготовку исследуемых образцов следует проводить непосредственно перед постановкой анализа.

Исследуемые образцы сывороток развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток. Для этого использовать вспомогательный ряд пробирок или вспомогательный планшет. К 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток добавить 10 мкл цельной сыворотки (плазмы), тщательно перемешать пипетированием. При этом

цвет раствора должен измениться с малинового на жёлтый. Если изменения цвета не произошло, сыворотка для анализа не пригодна.

7.2.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Готовить непосредственно перед использованием!

В отдельный чистый флакон внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, в зависимости от числа используемых стрипов (см таблицу расхода компонентов), тщательно перемешать.

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре (от 18 до 25 °C) не более 3 ч.

7.2.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

В отдельный чистый флакон внести необходимое количество субстратного буферного раствора, добавить соответствующее количество концентрата тетраметилбензидина, в зависимости от числа используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов), тщательно перемешать. Приготовленный раствор должен быть прозрачным и бесцветным.

Рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить при комнатной температуре (от 18 до 25 °C) не более 3 ч в защищенном от света месте.

Внимание! Раствор тетраметилбензидина должен быть бесцветным. Появление желтого окрашивания в течение нескольких минут после приготовления указывает на невозможность использования реагента и необходимость его замены. Для работы с раствором хромогена рекомендуется выделить отдельную посуду и отдельные наконечники для пипетки. После работы посуду и наконечники для пипетки следует ополоснуть водой, промыть 70% раствором этилового спирта и тщательно отмыть дистиллированной водой (синтетические моющие средства не применять, так как даже в следовых количествах они могут вызывать неконтролируемое разложение тетраметилбензидина в ходе реакции).

7.3. Проведение анализа

7.3.1. В две лунки планшета, например, А-1 и В-1 внести по 100 мкл K^+ . В три другие лунки, например С-1, D-1 и E-1 – по 100 мкл K^- .

Внимание! Перед использованием раствора для разведения сывороток флакон с раствором следует тщательно встряхнуть.

Во остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов. Перемешать пипетированием. Таким образом, исследуемые образцы в лунках оказываются разбавленными в 100 раз.

7.3.2. Планшет закрыть липкой пленкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре (37 ± 1) °C. За 5-10 мин до окончания инкубации приготовить рабочий раствор конъю-

гата (п. 7.2.6).

7.3.3. По окончании инкубации содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором (например, 6 % раствор перекиси водорода), планшет промыть 5 раз раствором для отмывки планшета (п.7.2.3) с помощью автоматического или ручного промывающего устройства. При этом в процессе одного промывания в каждую лунку вносить не менее 350 мкл раствора, выдержать лунки с промывочным раствором 30 сек, затем жидкость удалить. Отработанный промывочный раствор следует собрать в сосуд с дезинфицирующим средством.

Необходимо добиваться полного опорожнения лунок от промывочного раствора после каждого их заполнения.

По окончании промывания из лунок тщательно удалить влагу, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

7.3.4. Во все лунки с контрольными и исследуемыми образцами внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 7.2.6).

7.3.5. Планшет заклеить липкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.3.6. По окончании инкубации планшет промыть, как указано в п.7.3.3.

7.3.7. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.2.7) и инкубировать в защищенном от света месте в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 до 25°C).

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620 - 650 нм. Допускается измерение оптической плотности при одной длине волны 450 нм, при этом выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху. Измерение проводить сразу после остановки реакции.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

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

На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{cp} (K^-) + 0,2,$$

где: $ОП_{cp}$ (K^-) — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,2.

Среднее значение оптической плотности в лунках с положительным контрольным образцом ($ОП_{cp} K^+$) должно быть не менее 0,6.

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

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

где: $ОП_{обр}$ — оптическая плотность исследуемых сывороток.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание наборов не допускается.

Набор Вектоген Е-IgM должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности (9 мес).

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2-8) °С не более 4 нед.;

- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином; субстратный буферный раствор; раствор для предварительного разведения сывороток; раствор для разведения сывороток; раствор для разведения конъюгата; концентрат тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности;

- раствор для отмывки планшета можно хранить при температуре (2-8) °С не более 3 сут.;

- контрольные образцы и концентрат конъюгата можно хранить при температуре (2-8) °С не более 4 нед.;

- рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) не более 3 ч;

- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре не более 3 ч.

10.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную

сыворотку крови.

10.4. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 сут. при условии отсутствия микробной контаминации. Полученные образцы можно замораживать/оттаивать только один раз, т.к. повторное замораживание/оттаивание не допускается. После размораживания образцы следует тщательно перемешать. Замороженные образцы хранить при температуре минус 20 °С (и ниже).

10.5. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

10.6. Для отбора исследуемых образцов и реагентов использовать пилетки, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);

10.7. Запрещается использовать реагенты из наборов других серий и наборов других фирм-производителей.

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

По вопросам, касающимся качества набора «Вектоген Е-IgM», следует обращаться в **ЗАО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52,

и в **Федеральное государственное учреждение науки «Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича» Роспотребнадзора** по адресу:

119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел. (495) 241-39-22;

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

Старший научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



Н.И. Ливицкая



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РФ

Комитет медицинских иммунобиологических препаратов

г. Москва 121001 пер. Сивцев-Вражек 41

тел. 241-35-16 факс. 241-92-38

Выписка из протокола № 2

от 15.03.2007 г

Слушали:

О регистрации препаратов производства ЗАО «Вектор-Бест»:

- Вектоген Е-IgM, Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита Е;
- Вектоген Е-IgG, Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита Е.

Постановили:

Считать целесообразным рекомендовать к регистрации указанные препараты.

Зам. Председателя
Комитета МИБП

Ученый секретарь



Медуницын Н.В.

Воробьева М.А.