

СПЕЦИФИКАЦИЯ

«ВектоНВе – IgG»

Тест-система иммуноферментная для выявления
иммуноглобулинов класса G к НВе-антигену вируса гепатита В,

набор диагностический

Закрытое акционерное общество «Вектор-Бест»

Показатели	Методы	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный	Иммуносорбент – 96-луночный планшет с прозрачными бесцветными лунками, с сорбированным НВе-антигеном; K ⁺ – прозрачная жидкость красного цвета; K ⁻ – прозрачная бесцветная или светло-жёлтая жидкость с легкой опалесценцией; конъюгат, концентрат – прозрачная жидкость синего цвета; PPC, PPK – бесцветные или светло-желтые жидкости с лёгкой опалесценцией; СБР, стоп-реагент – прозрачные бесцветные жидкости; ФСБ-Т×25 – прозрачная бесцветная жидкость, в которой допускается выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре от 36 до 38 °С в течение 20–30 мин, при встряхивании пенится; ТМБ – прозрачная бесцветная жидкость.
Подлинность	ИФА	Тест-система должна выявлять IgG к НВеAg в положительных сыворотках стандартной панели предприятия (СПП), содержащих IgG к НВеAg, и в K ⁺ и не должна выявлять IgG к НВеAg в отрицательных сыворотках этой же стандартной

1	2	3
		панели, не содержащих IgG к HBeAg, и в К ⁻ .
рН	Потенциометри- ческий, ГФ XI	РРС, РРК – от 7,1 до 7,5. ФСБ-Т – от 7,1 до 7,5. СБР – от 3,9 до 4,1.
Специфическая активность	ИФА	Тест-система должна иметь чувствительность 100 % при проверке ее на положительных сыворотках СПП, содержащих IgG к HBeAg, и специфичность 100 % при проверке ее на отрицательных сыворотках СПП, не содержащих IgG к HBeAg.
Упаковка		Набор из 10 компонентов. Каждый компонент – в индивидуальной упаковке; 1 набор с инструкцией по применению – в коробке из картона.
Маркировка		В соответствии с ФСП.
Транспортирова- ние		В соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8°C; допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 3 суток. Замораживание не допускается.
Хранение		В соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8°C. Замораживание не допускается
Срок годности		9 месяцев.

В состав набора входят:

– иммуносорбент – рекомбинантный HBe-антиген вируса гепатита В (HBeAg) («DevaTal, INC.», США, кат. № 1233), иммобилизованный в лунках 96-луночного разборного полистиролового планшета для иммунологических реакций Testiks medisorp («SPL», Южная Корея, кат. № 38196), или Testiks maxisorp («SPL», Южная Корея, кат. № 38096), или Nunc polySorp («Nunc», Дания, кат. № 469078);

– положительный контрольный образец (K^+) – сыворотка крови человека в разведении 1:10, содержащая специфические антитела класса IgG к HBeAg и не содержащая антитела к ВИЧ-1, 2, к вирусу гепатита С, инактивированная прогреванием в течение 60 мин при 56 °С – жидкий;

– отрицательный контрольный образец (K^-) – сыворотка крови человека в разведении 1:10, не содержащая антитела к HBeAg, антитела к ВИЧ-1, 2, к вирусу гепатита С, инактивированная прогреванием в течение 60 мин при 56 °С – жидкий;

Примечание: Паспортизованные сыворотки для приготовления K^+ и K^- получают от Новосибирской станции переливания крови (согласно “Инструкции по заготовке и консервированию донорской крови”, 29.05.1995 г.). Наличие или отсутствие в них антител контролируют методом ИФА; проверку проводит отдел биотехнологического контроля ЗАО «Вектор-Бест» с использованием коммерческих тест-систем.

1 л K^+ и K^- содержит дополнительно:

Казеин («Sigma», США, кат. № С 0376) – 1,00 г;

Гентамицина сульфат («ICN», США кат. №1676245) – 0,1 г;

Твин-20 («Sigma», США, кат. № Р 1379) – 0,5 мл.

– конъюгат, концентрат – антитела к IgG человека («Sigma», США, кат. № Н 8125), меченные пероксидазой хрена («Sigma», США, кат. № R 5756) – жидкий;

Примечание: 1 л конъюгата содержит дополнительно:

Натрия хлорид (ГОСТ 4233-77) – 87,75 г;

Трис-оксиметиламинометан («Sigma», США, кат. № Т 6791) – 12,10 г;

Кислота соляная 1 М (ГОСТ 3113-77) – 55,00 мл;

Казеин («Sigma», США, кат. № С 0376) – 1,00 г;

Твин-20 («Sigma», США, кат. № Р 1379) – 0,50 мл;

Натрия мертиолят («Sigma», США кат. № Т 5125) – 0,10 г;

Бромфеноловый синий (ТУ-6-09-1058-76) – 0,20 г;

Дистиллированная вода (ГОСТ 6709-72) – до 1000 мл.

– раствор для разведения сывороток (PPC);

Примечание: 1 л PPC содержит:

Натрия хлорид (ГОСТ 4233-77) – 8,70 г;

Кислота ортофосфорная (ТУ 6-09-4229-76) – 1,80 мл;

Натрия гидроокись (ГОСТ 4328-77) – 1,80 г;

Казеин («Sigma», США, кат. № С 0376) – 1,00 г;

Натрия мертиолят («Sigma», США кат. № Т 5125) – 0,001 г;

Твин-20 («Sigma», США, кат. № Р 1379) – 0,5 мл;

Коричный альдегид («Merk», Германия кат. № 802505) – 0,2 мл;

Гентамицина сульфат («ICN», США кат. №1676245) – 0,1 г;

Дистиллированная вода (ГОСТ 6709-72) – до 1000 мл.

pH – от 7,1 до 7,5; коррекцию pH проводят раствором натрия гидроокиси (ГОСТ 4328-77) в концентрации 1 моль/л.

– раствор для разведения конъюгата (PPK);

Примечание: 1 л PPK содержит:

Натрия хлорид (ГОСТ 4233-77) – 8,70 г;

Кислота ортофосфорная (ТУ 6-09-4229-76) – 1,80 мл;

Натрия гидроокись (ГОСТ 4328-77) – 1,80 г;

Казеин («Sigma», США, кат. № С 0376) – 1,00 г;

Натрия мертиолят («Sigma», США кат. № Т 5125) – 0,001 г;

Твин-20 («Sigma», США, кат. № Р 1379) – 0,5 мл;

Коричный альдегид («Merk», Германия кат. № 802505) – 0,2 мл;

Гентамицина сульфат («ICN», США кат. №1676245) – 0,1 г.;

Дистиллированная вода (ГОСТ 6709-72) – до 1000 мл.

pH – от 7,1 до 7,5; коррекцию pH проводят раствором натрия гидроокиси

(ГОСТ 4328-77) в концентрации 1 моль/л.

– фосфатно-солевой буферный раствор с твином, концентрат (ФСБ-Т×25);

Примечание: 1 л ФСБ-Т×25 содержит:

Натрий фосфорнокислый 2-замещённый 12-водный
(ГОСТ 4172-76) – 71,60 г;

Натрий фосфорнокислый 1-замещённый 2-водный
(ГОСТ 245-76) – 7,80 г;

Натрия хлорид (ГОСТ 4233-77) – 109,62 г;

Твин-20 («Sigma», США, кат. № Р 1379) – 12,50 мл;

Дистиллированная вода (ГОСТ 6709-72) – до 1000 мл.

pH $7,3 \pm 0,2$, коррекцию pH проводят кислотой хлористоводородной (ГОСТ 3118-77) в концентрации 1 моль/л.

– субстратный буферный раствор (СБР);

Примечание: 1 л СБР содержит:

Натрий фосфорнокислый 2-замещённый 12-водный
(ГОСТ 4172-76) – 37,6 г;

Кислота лимонная моногидрат (ТУ 6-09-584-75) – 10,50 г;

Водорода перекись, медицинская 35 %

(ГОСТ 177-88, изменение №1 от 01.11.91) – 0,35 мл;

Дистиллированная вода (ГОСТ 6709-72) – до 1000 мл.

pH $4,0 \pm 0,1$, коррекцию pH раствором натрия гидроокиси (ГОСТ 4328-77) в концентрации 1 моль/л.

– тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 0,5 % раствор ТМБ («Sigma», США, кат. № Т 5513) в диметилформамиде («Merck», Германия, кат. № 103034), хромогенный субстрат пероксидазы;

– стоп-реагент – кислоты серной раствор (ГОСТ 14262-78), 1 М;

Набор рассчитан на 96 анализов, включая контроли.

Описание. Иммуносорбент – 96-луночный планшет с прозрачными бесцветными лунками, с сорбированным HBe-антигеном;

K⁺ – прозрачная жидкость красного цвета;

K⁻ – бесцветная или светло-желтая жидкость с лёгкой опалесценцией;

Конъюгат, концентрат – прозрачная жидкость синего цвета;

PPC, PPK – бесцветные или светло-желтые жидкости, с лёгкой опалесценцией;

СБР, стоп-реагент – прозрачные бесцветные жидкости;

ФСБ-Т×25 — прозрачная, бесцветная жидкость, в которой допускается выпадение осадка солей, растворяющегося при температуре от 36 до 38 °С в течение 20 – 30 мин, при встряхивании пенится;

ТМБ – прозрачная бесцветная жидкость;

Подлинность. Тест-система должна выявлять IgG к HBeAg в положительных сыворотках стандартной панели предприятия (СПП) (аттестована ОБТК ЗАО «Вектор-Бест», рег. № СОП-04-48), содержащих IgG к HBeAg, и в K⁺ и не должна выявлять IgG к HBeAg в отрицательных сыворотках этой же стандартной панели (СПП), не содержащих IgG к HBeAg, и в K⁻.

Определение проводят методом иммуноферментного анализа (ИФА) (см. раздел «Специфическая активность»).

pH. PPC, PPK – от 7,1 до 7,5;

ФСБ-Т после разведения концентрата – от 7,1 до 7,5;

СБР – от 3,9 до 4,1.

Определение проводят потенциометрически (ГФ XI, вып. 1, с. 113).

Специфическая активность. Тест-система должна иметь чувствительность 100 % при проверке ее на положительных сыворотках СПП, содержащих IgG к HBeAg, и специфичность 100 % при проверке ее на отрицательных сыворотках СПП, не содержащих IgG к HBeAg. При этом:

– среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОП_{ср}K⁻) должно быть $\leq 0,2$;

– среднее значение ОП в лунках с положительным контрольным образцом (ОП_{ср}K⁺) должно не менее, чем в 5 раз превышать ОП_{ср}K⁻.

Контроль проводят методом ИФА.

1. ПОДГОТОВКА РАСТВОРОВ И РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИФА

Для приготовления растворов следует использовать чистую мерную посуду, автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5 % и чистые одноразовые наконечники для пипеток.

1.1 Подготовка планшета

Пакет с планшетом вскрывают выше замка и закрепляют в рамке планшета необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно возвращают в пакет, удаляют из него воздух и пакет плотно закрывают на замок.

1.2 Приготовление раствора для отмывки планшета (ФСБ-Т)

Содержимое флакона с концентратом ФСБ-Т×25 взбалтывают и, при наличии осадка солей, прогревают при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка; после чего разводят дистиллированной водой до 700 мл. Хранят в течение 4 недель при температуре от 2 до 8 °С.

1.3 Подготовка сывороток СПП (рег. № СОП-04-48)

Положительные и отрицательные сыворотки стандартной панели предприятия (рег. № СОП-04-48) растворяют в указанном на этикетках соответствующих флаконов количестве дистиллированной воды.

1.4 Подготовка контрольных образцов

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

1.5 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовят непосредственно перед использованием.

В отдельный чистый флакон переносят 12,0 мл РРК, добавляют 1,2 мл концентрата конъюгата, тщательно перемешивают. Готовый рабочий раствор конъюгата может быть использован в течение 30 мин при условии его хранения при температуре от 18 до 25 °С.

1.6 Приготовление раствора ТМБ

Готовят непосредственно перед использованием.

При приготовлении раствора хромогена (ТМБ) следует исключить воздействие света. Для работы с раствором ТМБ следует использовать отдельные чистые наконечники для пипеток.

В отдельный чистый флакон вносят 12,0 мл СБР и добавляют 840 мкл ТМБ, тщательно перемешивают. Раствор ТМБ должен быть бесцветным! Готовый раствор ТМБ может быть использован в течение 20 мин при условии его хранения при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

2. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

2.1 Внесение контрольных образцов и сывороток СПП (рег. № СОП-04-48)

ПРЕДЛАГАЕМАЯ СХЕМА РАЗМЕЩЕНИЯ ОБРАЗЦОВ НА ПЛАНШЕТЕ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K ⁺	№1	№8	№15	№22							
B	K ⁺	№2	№9	№16	№23							
C	K ⁻	№3	№10	№17	№24							
D	K ⁻	№4	№11	№18								
E	K ⁻	№5	№12	№19								
F		№6	№13	№20								
G		№7	№14	№21								
H												

№n (n=1.....14) – положительные сыворотки СПП

№n (n=15.....24) – отрицательные сыворотки СПП

В две лунки планшета, например, А-1 и В-1 вносят по 100 мкл K⁺. В три другие, например, С-1, D-1 и Е-1 – по 100 мкл K⁻. В остальные лунки вносят по 90 мкл РРС и по 10 мкл приготовленных сывороток СПП (п.1.3).

2.2 Проведение инкубации

Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют в течение 30 мин при температуре 37°С. За 5-10 мин до окончания инкубации готовят рабочий

раствор конъюгата (п. 1.5).

2.3 Промывание планшета

По окончании инкубации содержимое лунок удаляют в сосуд с дезинфицирующим раствором (например, 6 % раствор перекиси водорода), планшет промывают 5 раз раствором для отмывки планшета (п.1.2) с помощью автоматического промывающего устройства или вручную (используя многоканальную пипетку). При этом в каждую лунку вносят не менее 300 мкл раствора. Отработанный ФСБ-Т после промывки планшета также собирают в сосуд с дезинфицирующим раствором.

Необходимо добиваться полного освобождения лунок от промывочного раствора после каждого их заполнения. Время этой между заполнением и опорожнением лунок должно составлять 30-60 с.

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

2.4 Внесение рабочего раствора конъюгата и инкубация

Во все лунки добавляют по 100 мкл свежеприготовленного рабочего раствора конъюгата (п. 1.5). Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют в течение 30 мин при температуре 37°C. За 5-10 мин до окончания инкубации готовят раствор ТМБ (п. 1.6).

2.5 Промывание планшета

По окончании инкубации планшет промыть, как указано выше (п. 2.3).

2.6 Внесение раствора ТМБ

В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл свежеприготовленного раствора ТМБ. Планшет выдерживают 25 мин при температуре от 18 до 25 °C в защищенном от света месте.

2.7 Добавление стоп-реагента

Реакцию останавливают добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента. Измерения оптической плотности (ОП) проводят не позднее 5 мин

после остановки реакции.

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

3. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620-650 нм. Допускается измерение оптической плотности на длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществляют по воздуху.

Результаты исследования учитывают при соблюдении следующих условий:

– среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{cp} K^-$) $\leq 0,2$;

– среднее значение ОП в лунках с положительным контрольным образцом ($ОП_{cp} K^+$) не менее чем в 5 раз превышает $ОП_{cp} K^-$.

Рассчитывают критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{cp} K^- + 0,200.$$

Результат анализа считают отрицательным, если значение оптической плотности исследуемого образца меньше $ОП_{крит}$.

Результат анализа считают положительным, если значение оптической плотности исследуемого образца равно или превышает $ОП_{крит}$.

Чувствительность набора вычисляют как долю положительно реагирующих сывороток от общего числа исследованных положительных сывороток СПП (рег. № СОП-04-48), согласно инструкции по применению СПП. Специфичность набора вычисляют как долю отрицательно реагирующих сывороток от общего числа исследованных отрицательных стандартных сывороток этой же панели.

Упаковка. Тест-систему выпускают в виде набора из 10 компонентов. Каждый компонент в индивидуальной упаковке:

- Иммуносорбент – планшет разборный для иммунологических реакций, упакованный в пакет размером 115×150 мм из полиэтиленовой пленки по ГОСТ 10354-82 или из цефлена («Polymeric», Бельгия, кат. № С 211) с силикагелем («Sigma», США, кат. № S 8394) – 1 шт.;
- Положительный контрольный образец (K^+), инактивированный – 1,5 мл в пластиковом флаконе вместимостью 4,0 мл («Митра», Беларусь, кат. № ВМ.04) с завинчивающимся колпачком («Митра», Беларусь, кат. № М.1) или в ином – 1 фл.;
- Отрицательный контрольный образец (K^-) – 3,0 мл в такой же упаковке – 1 фл.;
- Конъюгат, концентрат – 1,5 мл в такой же упаковке – 1 фл.;
- Фосфатно-солевой буферный раствор с твином, концентрат (ФСБ-Т×25) – 28,0 мл в пластиковом флаконе вместимостью 30,0 мл с завинчивающейся крышкой («Zinsser Analytik», Германия, кат. № 3071430) – 1 фл.;
- Субстратный буферный раствор (СБР) – 13,0 мл в пластиковом флаконе вместимостью 13,0 мл («Митра», Беларусь, кат. № ВМ.13) с завинчивающимся колпачком («Митра», Беларусь, кат. № М.2); или в стеклянном флаконе вместимостью 13,5 мл («Medical Glass», Словакия, кат. № 10R), закупоренном резиновой пробкой («Helvoet Pharma», Бельгия, кат. № V9127) и завальцованном алюминиевым колпачком (ГОСТ Р 51314-99) – 1 фл.;
- Раствор для разведения сывороток (РРС) – 12,0 мл в такой же упаковке – 1 фл.;
- Раствор для разведения конъюгата (РПК) – 12,0 мл в такой же упаковке – 1 фл.;
- Тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1,0 мл в пластиковом флаконе вместимостью 4,0 мл («Митра», Беларусь, кат. № ВМ.04) с завинчивающимся колпачком («Митра», Беларусь, кат. № М.1) – 1 фл.;

– Стоп-реагент – 12,0 мл в пластиковом флаконе вместимостью 13,0 мл («Митра», Беларусь, кат. № ВМ.13) с завинчивающимся колпачком («Митра», Беларусь, кат. № М.2) – 1 фл.;

На каждый флакон или пакет должна быть наклеена этикетка самоклеющаяся («Нерта», Германия, кат. № 4271).

Наборы тест-системы упаковывают в коробку из картона (ТУ-13-0281020-97-90) размером 180×107×100 мм. В коробку вкладывают инструкцию по применению. Требуемое количество коробок с наборами и упаковочный лист упаковывают в ящик из картона гофрированного (ГОСТ 13513-86). Содержание упаковочного листа должно соответствовать РД - 42-1100/1440-99-113. На каждый ящик должна быть наклеена этикетка из бумаги для печати типографской (ГОСТ 9095-89Е).

Маркировка. На этикетке планшета и флаконов должно быть указано: сокращенное название предприятия-изготовителя (ЗАО «Вектор-Бест»), торговое название тест-системы, название компонента, объём в мл, номер серии и срок годности. На этикетках контрольных образцов (K^+ и K^-) дополнительно должно быть указано: «инактивированный».

На коробке должно быть указано: логотип предприятия, название предприятия-изготовителя, его юридический адрес и телефон/факс, торговое и общепринятое название тест-системы, лекарственная форма, состав набора с указанием количества каждого компонента в мл (для жидких компонентов во флаконах) и количества флаконов, а также количества упаковок с иммуносорбентом (в шт.), сведения об инаktivации контрольных образцов, количество определений, номер серии, дата изготовления, срок годности, регистрационный номер и дата регистрации, номер лицензии и срок ее действия, штрих-код EAN, условия хранения, предупредительные надписи: «Только для *in vitro* диагностики», «Хранить в недоступном для детей месте», «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений».

На ящик наносят дополнительные предупредительные надписи: «БИОПРЕПАРАТЫ», «СОБЛЮДЕНИЕ ИНТЕРВАЛА ТЕМПЕРАТУР».

Графическое оформление маркировки флаконов, коробки по РД-42-1100/1440-99-113, транспортной тары – по ГОСТ 14192-96.

Транспортирование. В соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8 °С; допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 3 суток. Замораживание не допускается.

Хранение. В соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8°С. Замораживание не допускается.

Срок годности 9 месяцев.

Назначение. Выявление иммуноглобулинов класса G к HBe-антигену вируса гепатита В в сыворотке (плазме) крови человека.

Примечание: Реактивы, приведённые в настоящей фармакопейной статье предприятия, описаны в соответствующих разделах Государственной фармакопеи, XI издания, вып. 2.

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов
«19» 04 2006 г.

СОГЛАСОВАНО:

Директор ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора,
Руководитель НОК МИБГ



Н.В. Медуницын
«19» 04 2006 г.

Главный ученый секретарь
Фармакопейного
государственного комитета,
Директор ИСЛС



В.Л. Багирова
«25» 04 2006 г.

Борис
ВЛ