

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2007 г. № _____

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

«Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

_____ 2007 г.

М.П.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов

класса М к вирусу гепатита Дельта

(Вектогеп Д – IgM)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Способ определения IgM к вирусу гепатита Дельта (ВГД) проводится методом иммуноферментного анализа (метод «захвата»). Метод основан на взаимодействии IgM, содержащихся в сыворотке крови, с моноклональными антителами против IgM человека, иммобилизованными в лунках полистиролового планшета. Специфические IgM к ВГД выявляют с помощью конъюгата рекомбинантного антигена ВГД с пероксидазой хрена.

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

Во время второй инкубации связавшиеся иммуноглобулины класса М к ВГД взаимодействуют с добавленным в лунки рекомбинантным антигеном ВГД, конъюгированным с пероксидазой.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией НИИ СД И.Н. Кувишиновой

После удаления избытка несвязавшегося конъюгата, во время инкубации с раствором ТМБ, происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации иммуноглобулинов класса М к ВГД в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к иммуноглобулинам класса М человека (1 шт.);
- положительный контрольный образец (K^+), сыворотка крови человека в разведении 1:100, содержащая IgM к вирусу гепатита Дельта (ВГД) (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-), сыворотка крови человека в разведении 1:100, не содержащая IgM к ВГД (2,5 мл);
- конъюгат, концентрат (1,5 мл);
- фосфатно-солевой буферный раствор с твином, концентрат ($\times 25$) (28 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (10 мл);
- раствор для разведения сывороток (12 мл);
- раствор для разведения конъюгата (12 мл);
- субстратный буферный раствор (13 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат (1,0 мл);
- стоп-реагент (12 мл);
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки на 4–200 мкл – 16 шт.;
- планшет для предварительного разведения образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

- среднее значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{cp} K^-$) $\leq 0,25$;
- среднее значение ОП в лунках с положительным контрольным образцом ($ОП_{cp} K^+$) $\geq 0,6$.

3.2. Чувствительность должна быть 100 % при титровании СОП+, содержащего IgM к ВГД; при этом титр выявляемых специфических IgM должен быть не менее 1:16.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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, противозидемического 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.

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.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм;

– термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

– 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 планшет;

– перчатки резиновые хирургические;

– бумага фильтровальная лабораторная;

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

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации. Полученные образцы можно замораживать/оттаивать только один раз, т.к. повторное замораживание/оттаивание приводит к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать. Замороженные образцы хранить при температуре минус 20 °С (и ниже).

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

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил:

- не проводить ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгата;
- не использовать реагенты с истекшим сроком годности;
- использовать стеклянную посуду, тщательно вымытую и ополоснутую дистиллированной водой, или (предпочтительно) одноразовую посуду;
- аккуратно разводить реагенты, избегая любого загрязнения;
- не допускать высыхания стрипов в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов;
- не допускать контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и растворами субстратов, так как ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металла;
- использовать для внесения каждой пробы чистый наконечник;
- не использовать одну и ту же емкость для приготовления конъюгата и раствора тет-

раметилбензида; малейшее, даже не видимое глазом, загрязнение пипеток раствором конъюгата может привести к контаминации всего содержимого флаконов с субстратным буферным раствором и концентратом тетраметилбензида;

– протирать рабочую поверхность стола и конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% раствором этилового спирта перед внесением тетраметилбензида в субстратный буферный раствор;

- не изменять протокол исследований;
- исключить вероятность получения ложнопозитивных результатов, которые могут быть обусловлены: контаминацией отрицательных образцов сыворотки (плазмы) в рабочем и вспомогательных планшетах положительными образцами из соседних лунок;

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) не менее 1 ч.

7.2. 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 немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы после первого вскрытия пакета можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 4 нед.

7.3. Приготовление раствора для отмывки планшета.

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

Приготовленный раствор для отмывки планшета можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут.

7.4. 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 от 2 до 8 °С не более 4 нед.

7.5. Подготовка исследуемых образцов

Подготовку исследуемых образцов следует проводить непосредственно перед постановкой анализа.

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РПРС), используя планшет для предварительного разведения, входящий в состав набора. К 90 мкл РПРС добавить 10 мкл цельной сыворотки (плазмы), тщательно перемешать пипетированием. При этом цвет раствора должен измениться с тёмно-красного на жёлтый. Если изменения цвета не произошло, сыворотка для анализа не пригодна.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

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

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) не более 1 ч.

Таблица

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

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

В пластиковую ёмкость внести необходимое количество субстратного буферного раствора, добавить соответствующее количество концентрата тетраметилбензидина, в зависимости от числа используемых стрипов (см. таблицу), 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 голубого окрашивания в течение нескольких минут после приготовления указывает на невозможность использования реагента и на 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).

7.8. 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 Е-1 – по 100 мкл K^+ .

Во остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов. Таким образом, исследуемые образцы в лунках оказываются разбавленными в 100 раз.

7.9. Планшет закрыть липкой пленкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре $(37 \pm 1) ^\circ C$.

7.10. 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.7.3) с помощью автоматического или ручного промывающего устройства. При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл раствора. Отработанный раствор для отмывки планшет после промывки планшета также собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором.

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

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

7.11. Во все лунки с контрольными и исследуемыми образцами внести по 100 мкл ра-

бочего раствора конъюгата (см п. 7.6).

7.12. Планшет заклеить липкой пленкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.13. По окончании инкубации планшет промыть, как указано выше.

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

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. 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 не позднее 5 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Провести оценку результатов:

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

9.1.2. На основании полученных данных вычислить критическое значение оптической плотности ($\text{ОП}_{\text{крит}}$) по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}_{\text{ср}}(\text{K}^-) + 0,2,$$

где: $\text{ОП}_{\text{ср}}(\text{K}^-)$ – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.2. Оценка результатов

9.2.1. Среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,25.

9.2.2. Среднее значение оптической плотности в лунках с положительным контрольным образцом ($\text{ОП}_{\text{ср}} \text{K}^+$) должно быть не менее 0,6.

9.2.3. Результат анализа считают отрицательным, если $\text{ОП}_{\text{обр}} < \text{ОП}_{\text{крит}}$.

Результат анализа считают положительным если $\text{ОП}_{\text{обр}} \geq \text{ОП}_{\text{крит}}$

где: $\text{ОП}_{\text{обр}}$ – оптическая плотность исследуемых образцов.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

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

Набор Вектогеп Д-IgM должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 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 от 2 до 8 °С не более 4 нед.;

- фосфатно-солевой буферный раствор с твином, концентрат; субстратный буферный раствор; концентрат тетраметилбензидина 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 для отмывки планшета можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут.;

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

- рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) не более 1 ч;

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

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

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

По вопросам, касающимся качества набора «Вектогеп Д-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 стандартиза-
ции и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспот-
ребнадзора по адресу:

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

Зав. лабораторией
маркеров вирусных инфекций НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



И.Н. Кувшинова

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов