

УТВЕРЖДЕНА

«УТВЕРЖДАЮ»

КОПИЯ

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____



И.о. Генерального директора
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
В. Н. Михеев

20 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«контрольный препарат поверхностного антигена HBsAg
вируса гепатита В субтипов AD и AY»
«Вектор КП-HBsAg»

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Вектор КП-НВsAg» применяется в клинической лабораторной диагностике. Он предназначен для оценки чувствительности наборов реагентов, автоматических анализаторов, методов выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (НВsAg), для их контроля на стадиях производства и выпуска, для научно-исследовательских и производственных целей, внешнего и внутреннего контроля качества работы диагностических лабораторий, для количественного определения НВsAg в исследуемых образцах сыворотки или плазмы крови человека методами сравнения с данным контрольным препаратом.

2 ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ, УЧАСТВУЮЩЕМУ В ВЫПОЛНЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончившие соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-IV групп патогенности.

3 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

3.1 Принцип действия

«Вектор КП-НВsAg» представляет собой набор реагентов, в состав которого входят два лиофильно высушенных реагента, содержащих АУ и АД субтипы поверхностного антигена вируса гепатита В, количество каждого точно определено для текущей серии набора в Международных Единицах; и разводящий реагент – жидкий пул негативных по содержанию НВsAg сывороток крови человека.

Препарат «Вектор КП-НВsAg» содержит определенное количество НВsAg для каждого субтипа (АД и АУ) и это количество остается неизменным в течение срока годности препарата. Набор имеет один вариант комплектации, рассчитанный не менее чем на три повтора в анализе.

3.2 Состав набора

Наименование реагента	Количество
КП-НВsAg субтип АУ – инактивированная лиофилизированная сыворотка крови человека, содержащая точно определенное для текущей серии набора количество НВsAg субтипа АУ в Международных Единицах (в паспорте серии и на этикетке флакона указан необходимый для восстановления до концентрации $(0,200 \pm 0,005)$ МЕ/мл объем воды очищенной) – флакон с таблеткой желтого цвета	1 фл.
КП-НВsAg субтип АД – инактивированная лиофилизированная сыворотка крови человека, содержащая точно определенное для текущей серии набора количество НВsAg субтипа АД в Международных Единицах (в паспорте серии и на этикетке флакона указан необходимый для восстановления до концентрации $0,2 \pm 0,005$ МЕ/мл объем воды очищенной) – флакон с таблеткой желтого цвета	1 фл.
Разводящий реагент (РР) – пул негативных по содержанию НВsAg и антител к нему сывороток крови человека, инактивированных прогреванием, с консервантом «Proclin 300»; жидкий, готовый к применению, используемый для разведения КП-НВsAg – однородная желтоватая прозрачная жидкость без осадка и хлопьев, допускается опалесценция	1 фл., 10,0 мл

3.3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Производителем выявлено соответствие каждой серии «Вектор КП-НВsAg» аналитическим и диагностическим характеристикам, которые являются критериями методики контроля качества изделия для потребителей:

3.3.1 Чувствительность. При постановке на зарегистрированных в РФ в качестве медицинских изделий наборах для иммуноферментной диагностики «НВsAg-ИФА – БЕСТ» или других аналогичных, одновременно с набором реагентов «ДС-СО-НВsAg» производства ООО «НПО «Диагностические системы» и «Международным стандартом НВsAg NIBSC code 80/549», как самое слабое положительное разведение выявляется 0,01 МЕ/мл обоих субтипов АУ и АД набора «Вектор КП-НВsAg» при самом слабом положительном разведении 0,01 МЕ/мл набора «ДС-СО-НВsAg» или «Международного стандарта НВsAg NIBSC code 80/549».

3.3.2 Специфичность. При постановке Разводящего реагента РР на зарегистрированных в РФ в качестве медицинских изделий наборах для иммуноферментной диагностики «НВsAg-ИФА – БЕСТ» или других аналогичных, РР показывает отрицательный результат.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609, Приказ Минздрава России от 6 июня 2012 г. № 4 н).

4.2 При работе с набором соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Утв. МЗ СССР 17 января 1991 г.).

4.3 Все реагенты набора являются нетоксичными.

4.4 При работе с исследуемыми и контрольными образцами рассматривать их как потенциально инфекционный материал и использовать средства индивидуальной защиты (халат, шапочку или косынку, кожаные тапочки, одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, защитные очки), не пипетировать растворы ртом.

4.5 Все использованные материалы, инструменты и оборудование, рабочее место дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113.

4.6 Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7 Утилизация набора реагентов с истекшим сроком годности и отработанных препаратов должна соответствовать требованиям СанПиН 2.1.7.2790–10

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Пипетки со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования с погрешностью не более 3 %;
- набор реагентов для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В;
- необходимое оборудование и дополнительные материалы для используемого набора реагентов согласно инструкции по применению;
- вода очищенная не ниже III класса чистоты для восстановления КП-НВsAg.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Минимальный объем исследуемого на содержание и количество НВsAg образца сыворотки (плазмы) крови не менее 300 мкл.

Желательно исследование свежих образцов. Допустимо использование образцов, хранившихся при температуре от 2 °С до 8 °С не более семи суток либо при температуре от минус 35 °С до минус 25 °С не более шести месяцев.

Образцы, содержащие взвешенные частицы, перед исследованием следует центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин для исключения неправильного результата анализа.

Проросшие, гемолизированные, гиперлипидные образцы, а также и более чем однократно подвергшиеся заморозке — оттаиванию, исследованию не подлежат.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Несоблюдение описанных ниже требований может привести к искажению результатов анализа.

7.1.1 При проведении анализа нельзя использовать реагенты из наборов разных серий. Не использовать реагенты с истекшим сроком годности.

7.1.2 Для приготовления вариантов разведения использовать одноразовые емкости (или планшеты с несорбирующими поверхностями) и наконечники для дозаторов.

7.1.3 Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только раствором 70 % этилового спирта, не использовать во время проведения анализа перекись водорода, хлорамин и другие хлорсодержащие вещества.

7.1.4 Для дезинфекции отходов реагентов набора, вспомогательных материалов и исследуемых образцов рекомендуется использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество анализа (не содержащие активный кислород и хлор, ионы тяжелых металлов), например средства на основе спиртов, третичных аминов или четвертичных аммониевых соединений.

7.1.5 Все устройства дозирования и измерительные приборы, используемые при работе с «Вектор КП-НВsAg», должны быть аттестованы и поверены.

7.2 Приготовление реагентов

7.2.1 Приготовление разводящего реагента (РР)

РР выдержать при температуре от 17 до 27 °С в течение 30 мин. Хорошо перемешать, не допуская образования пены. Отобрать необходимое для применения количество в чистую, желательно одноразовую емкость дозатором с одноразовым наконечником.

Хранение: оставшийся объем РР в течение срока годности набора при температуре не выше 8 °С.

7.2.2 Приготовление КП-НВsAg субтип АУ и КП-НВsAg субтип АД

КП-НВsAg субтип АУ и КП-НВsAg субтип АД восстановить до концентрации НВsAg ($0,200 \pm 0,005$) МЕ/мл водой очищенной не ниже III класса чистоты, внеся ее во флаконы в количестве, указанном в паспорте серии набора и на этикетке флакона. Восстановленные КП-НВsAg выдержать при температуре от 17 до 27 °С в течение 30 мин. Хорошо перемешать, не допуская образования пены. Отобрать необходимое для применения количество в чистые, желательно одноразовые емкости дозатором с одноразовыми наконечниками.

Хранение: восстановленные КП-НВsAg субтип АУ и КП-НВsAg субтип АД при температуре от 2 °С до 8 °С в течение одного месяца, при температуре минус 25 °С в течение шести месяцев. Допускается их трехкратное замораживание-оттаивание.

7.2.3 Приготовление разведений КП-НВsAg субтип АУ и КП-НВsAg субтип АД

Приготовить по шесть вариантов независимых разведений КП-НВsAg обоих субтипов. Рекомендуется приготовить не менее чем в трех повторах следующие варианты разведений КП-НВsAg обоих субтипов: 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 МЕ/мл. Это в большинстве случаев позволяет работать в линейной области регистрации сигнала приборами, используемыми для сканирования результатов анализа концентрации НВsAg. Для приготовления трех повторов всех разведений с запасом при использовании в одном повторе 0,1 мл разведения см. Таблицу 2.

Таблица 2. Приготовление разведений и отрицательного образца

№ разведения	Концентрация НВsAg, МЕ/мл	Взять КП-НВsAg субтип АУ или КП-НВsAg субтип АД	Взять РР
1	0,2	400 мкл	-
2	0,1	200 мкл	200 мкл
3	0,05	100 мкл	300 мкл
4	0,02	40 мкл	360 мкл
5	0,01	20 мкл	380 мкл
6	0,005	10 мкл	390 мкл
7	отрицательный образец	-	400 мкл

Каждое разведение КП-НВsAg обоих субтипов следует готовить независимо в отдельной емкости, из исходного КП-НВsAg, чтобы корректно оценить погрешность результатов анализа.

7.3 Постановка анализа

Перед постановкой анализа все реагенты набора и анализируемые образцы необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре от 17 °С до 27 °С.

7.3.1 При определении чувствительности и специфичности метода, анализатора или набора реагентов анализ проводить в соответствии с требованиями Инструкции по применению производителя (разработчика).

7.3.2 Для определения чувствительности метода, анализатора или набора реагентов использовать одновременно не менее трех повторов каждого варианта разведения КП-НВsAg обоих субтипов (см. п.7.2.3).

7.3.3 Для количественного определения концентрации НВsAg в исследуемом образце анализировать его в трех повторах. При необходимости готовить разведения исследуемого образца в 2, 4, 8, 20, 40 и 80 раз в РР. Анализ выполнять в одной постановке с тремя повторами шести разведений обоих субтипов НВsAg.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты анализа учитывать в соответствии с требованиями Инструкции по применению производителя (разработчика).

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Вычислить среднее зарегистрированное значение для каждого сигнала от разведения исследуемого образца (если были сделаны разведения) и для всех разведений каждого из субтипов НВsAg. Если какое-либо значение отклоняется от средней величины в соответствующей группе более чем на 15 %, его следует исключить из расчета.

9.2 Определить чувствительность по средним значениям. Она равна большей из двух для субтипов АУ и АД. Например, если набор реагентов выявляет HBsAg субтипа АУ в концентрации 0,005 МЕ/мл, а субтип АД в концентрации 0,01 МЕ/мл, то чувствительность этого набора реагентов равна 0,01 МЕ/мл.

9.3 Определить количество HBsAg в исследуемом образце.

9.3.1 Вычислить логарифм для всех средних зарегистрированных значений и всех концентраций сделанных разведений HBsAg.

9.3.2 Построить калибровочный график зависимости логарифма сигнала от логарифма концентрации HBsAg. Логарифм сигнала откладывается по оси ординат, а логарифм концентрации HBsAg откладывается по оси абсцисс. На графике отрезками соединяются точки, соответствующие средним каждого разведения отдельно для каждого субтипа. Результатом являются две ломаные линии.

9.3.3 Вычислить логарифм для среднего зарегистрированного значения сигнала от разведений исследуемого образца (если они были сделаны). Отложить логарифмы по оси ординат калибровочного графика.

9.3.4 Провести на калибровочном графике параллели оси абсцисс через отложенные логарифмы до пересечения с ломаными.

9.3.5 Провести из точек пересечения вертикали до оси абсцисс. Зарегистрировать полученные значения логарифмов. Вычислить антилогарифмы доз HBsAg в исследуемом образце по обоим субтипам. Усреднить их для каждого разведения исследуемого образца (при наличии разведений).

9.3.6 При наличии разведений исследуемого образца умножить усреднение на кратность разведения. Найти среднее значение количества HBsAg в исследуемом образце с учетом кратности разведения. Окончательно количество HBsAg в исследуемом образце равно полученному среднему значению. Точность определения находится в интервале от меньшего среднего значения до большего среднего значения двух субтипов.

Для ориентировочной оценки количественного содержания HBsAg в исследуемом образце при величине сигнала от исследуемого образца большей чем от разведений субтипов HBsAg 0,2 МЕ/мл, считать содержание HBsAg в исследуемом образце более 0,2 МЕ/мл.

9.4 Для точного количественного определения концентрации HBsAg в исследуемом образце необходимо использовать метод серийных разведений (анализировать его в трех повторах неразведенным и разведения в 2, 4, 8, 20, 40 и 80 раз) параллельно с приготовленными разведениями СО-HBsAg. При этом для расчета концентрации HBsAg и ее 95 % доверительного интервала следует использовать метод дисперсионного анализа (В.Г.Петухов, «Биопрепараты», №1(13), с.19-23, 2004). Ввиду сложности расчетов и во избежание ошибок при вычислениях рекомендуется использовать компьютерную программу.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Срок годности набора реагентов «Вектор КП-HBsAg» 12 месяцев.

Набор реагентов «Вектор КП-HBsAg» хранить и транспортировать при температуре от 2 °С до 8 °С в соответствии с СП 3.3.2.1248-03. Допускается транспортирование при температуре до 27 °С не более пяти суток.

Для диагностики «in vitro».

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

11 БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение неиспользованных компонентов набора или наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

12 ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Федеральное бюджетное учреждение «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»).

630559, Россия, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. (383) 336-60-10, факс (383) 336-74-09.

Зам. генерального директора
по научной работе
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»



А.П. Агафонов

Зав ОБТК
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»



М.П. Богрянцева



В данном документе
прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 7 листов

Сильвестров
прописью
З.В.О.Б.т.к. Борянцев
должность, подпись