

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
суммарных антител к core-антигену вируса гепатита В
(ВектоНВсAg-антитела)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления суммарных антител к core-антигену вируса гепатита В «ВектоНВсAg-антитела» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления суммарных антител к core-антигену вируса гепатита В (НВсAg) в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли или 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Основными реагентами набора являются: рекомбинантный core-антиген вируса гепатита В, сорбированный на поверхности лунок полистиролового разборного планшета, конъюгат моноклональных антител к НВсAg с пероксидазой хрена, положительный и отрицательный контрольные образцы.

Способ определения антител к НВсAg представляет собой твердофазный конкурентный иммуноферментный анализ, в ходе которого исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованным НВсAg в присутствии конъюгата – моноклональных антител к НВсAg, конъюгированных с пероксидазой хрена. При этом происходит конкурентное связывание антител к НВсAg, присутствующих в исследуемых образцах, и антител к НВсAg, входящих в состав конъюгата, с НВсAg, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок.

После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и конъюгата и добавления в лунки планшета раствора ТМБ образуется окрашенный продукт, интенсивность окраски ко-

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым и нач. лабораторией И.Н. Кувшиновой.

торого обратно пропорциональна концентрации антител к НВсАg в анализируемом образце.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок рекомбинантным НВсАg, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий антитела к НВсАg, готовый для использования – 1 флакон (1,0 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий антитела к НВсАg, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к НВсАg с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Тх25) – 1 флакон (28 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Принадлежности:

- пленки для заклеивания планшета – 1 шт.;
- ванночки для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для дозаторов на 2-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления антител к НВсАg – соответствие результатов определения набором антител к НВсАg требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-199), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: значения оптической плотности в лунках с положительными образцами $ОП_{\#1-\#8} \leq ОП_{крит.}$

3.2. Специфичность выявления антител к НВсАg – соответствие результатов определения набором антител к НВсАg требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-199), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: значения оптической плотности в лунках с отрицательными образцами $ОП_{\#9-\#24} > ОП_{крит.}$

3.3. Диагностическая чувствительность выявления суммарных антител к сое-антигену вируса гепатита В: клинические испытания, проведенные на 275 положительных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 200 пациентов, показали 100% чувствительность (интервал 98,5%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.4. Диагностическая специфичность выявления суммарных антител к core-антигену вируса гепатита В: клинические испытания, проведенные на 278 отрицательных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 203 пациентов, показали 100 % специфичность (интервал 98,5%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г и в методических указаниях МУ 287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998 г).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других 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.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Са-

нитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;

- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5-5000 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа можно использовать образцы плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата, гепарина или ЭДТА.

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

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 6 мес.

Следует избегать многократного замораживания/оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C .

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25 °С не менее 60 мин.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°С в течение срока годности набора.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°С до полного растворения осадка.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.4. Подготовка положительного и отрицательного контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) отобрать в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ.

Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным

раствором ТМБ).

Раствор ТМБ после первого вскрытия флакона можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Внимание! Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

7.7. Подготовка стоп-реагента.

Стоп-реагент готов к использованию.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
1	2,0	До 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. В лунку А-1 внести 50 мкл положительного контрольного образца (K^+), в лунки В-1, С-1 внести по 50 мкл отрицательного контрольного образца (K^-).

В остальные лунки внести по 50 мкл исследуемых образцов.

Время внесения образцов не должно превышать 15 мин при использовании всех лунок планшета.

8.2. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (п.7.5).

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

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

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ (п. 7.6).

Для внесения раствора ТМБ использовать ванночку для реагента и одноразовые накопники, входящие в состав набора.

Планшет выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

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

8.6. Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Допускается измерение без использования референс-фильтра.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не менее 1,2 ед. опт. плотн.

Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не более 0,3 ед. опт. плотн.

Только в случае соблюдения указанных условий можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

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

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср. K^-} / 2$$

где: $ОП_{ср. K^-}$ — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом, измеренное в двухволновом режиме 450/620–655 нм (или только с фильтром 450 нм).

9.3. Результат анализа положительный, если $ОП_{обр} \leq ОП_{крит.}$

Результат анализа отрицательный если $ОП_{обр} > ОП_{крит}$.

где: $ОП_{обр}$ – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 18 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор тетраметилбензидина; контрольные образцы; конъюгат и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

10.4. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, раствор ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

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

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «ВектоНВсAg-антитела», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, а/я 121,

тел. (383) 227-67-64, 227-75-40

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Начальник лаборатории маркеров
вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

И.Н. Кувшинова

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"

"22" 03 / 20 22 г. Масяго А.В.

