

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для иммуноферментного
выявления иммуноглобулинов класса G к HBe-антигену вируса гепатита В
(ВектоHBe-IgG)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к HBe-антигену вируса гепатита В «ВектоHBe-IgG» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G (IgG) к HBe-антигену вируса гепатита В (HBeAg) в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на двухстадийном твердофазном иммуноферментном анализе. Основными реагентами набора являются: рекомбинантный HBeAg, сорбированный на поверхности лунок полистиролового разборного планшета, конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, положительный и отрицательный контрольные образцы.

Анализ проводят в две стадии. На первой стадии в ходе инкубации исследуемых и контрольных образцов в лунках планшета происходит связывание содержащихся в анализируе-

мых образцах антител к НВеАg с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок планшета НВеАg. Во время второй инкубации связавшиеся специфические IgG взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена.

Образовавшиеся иммунокомплексы «антиген-антитело-конъюгат» выявляются ферментативной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к НВеАg в анализируемом образце.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок рекомбинантным НВеАg, готовый для использования – 1 шт;
- положительный контрольный образец (К+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgG к НВеАg, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (К-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к НВеАg, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (12 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
- пленки для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для дозаторов на 2-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *

3.1. Чувствительность выявления IgG к НВеАg – соответствие результатов определения набором IgG к НВеАg требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-73), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: значения оптической плотности в лунках с положительными образцами $OP_{\text{пел-нвг}} \geq OP_{\text{крит}}$.

3.2 Специфичность выявления IgG к НВеАg – соответствие результатов определения набором IgG к НВеАg требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-73), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: значения оптической плотности в

лунках с отрицательными образцами $ОП_{\text{№9-№24}} < ОП_{\text{крит.}}$

3.3. Диагностическая чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G к HBe-антигену вируса гепатита В: клинические испытания, проведенные на 263 положительных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 188 пациентов, показали 100 % чувствительность (интервал 98,4 %-100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к HBe-антигену вируса гепатита В: клинические испытания, проведенные на 290 отрицательных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 215 пациентов, показали 100 % специфичность (интервал 98,6 %-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 пораженный 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 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 кон-

трольными 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 «Санитарно-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». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по 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 10-5000 мкл;
- дозаторы полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 10 до 300 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 100 и 1000 мл;
- колба вместимостью 100 и 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать образцы сыворотки или 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 взвешенные частицы, 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 и анализируемые образцы при температуре от 18 до 25 °C 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°C 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.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °C в течение срока годности набора.

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, перенести раствор в колбу, тщательно перемешать.

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

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

7.4. Подготовка контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

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 реагентов необходимое количество конъюгата.

После проведения ИФА остатки конъюгата из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

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 реагентов необходимое количество раствора ТМБ.

После проведения ИФА остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).

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.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

7.7. Подготовка стоп-реагента.

Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

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

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
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 две лунки стрипа, например, в А-1 и В-1, внести по 100 мкл К⁻; в одну лунку, например, С-1, 100 мкл К⁺.

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл исследуемых образцов, тщательно перемешать, при этом цвет раствора меняется с фиолетового на синий.

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

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре (37±1) С.

8.2. 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 заподнение 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.

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

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники. Планшет заклеить липкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (37±1)°С.

8.4. По окончании инкубации лунки планшета промыть (п. 8.2).

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

Планшет выдержать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре

от 18 до 25 °С.

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

8.7. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 655 нм; или при длине волны 450 нм. 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 более 0,2 ед. опт. плотн.

Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 1,0 ед. опт. плотн.

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

9.2. Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит.}$) по формуле:

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср.}(K^-) + 0,2$$

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).

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

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

где $ОП_{обр.}$ — оптическая плотность в лунке с исследуемым образцом.

9.5. Результаты анализа можно оценивать по коэффициенту позитивности (КП).

Для расчета коэффициента позитивности образцов использовать формулу:

$$КП_{обр.} = \frac{ОП_{обр.}}{ОП_{крит.}}$$

9.6. Результат анализа считается положительным, если $КП_{обр.} \geq 1$.

Результат анализа считается отрицательным, если $КП_{обр.} < 1$

где $КП_{обр.}$ — коэффициент позитивности анализируемого образца.

Расчет КП целесообразно проводить для оценки концентрации специфических антител в исследуемых образцах и при наблюдении за изменением концентрации IgG к HBeAg в динамике в парных образцах. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации IgG к HBeAg в сыворотке (плазме)

крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

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 годности.

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

- неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор ТМБ и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;
- контрольные образцы и конъюгат после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;
- промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

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

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

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 «ВектоHBe-IgG», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, 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 10 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"



Масяго А.В.
20 23 г.