

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«13»  2022 г.

М.П.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита Дельта
(Вектоген D-IgM)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита Дельта «Вектоген D-IgM» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М (IgM) к вирусу гепатита Дельта (ВГД) 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 конт-роли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Способ выявления IgM к 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 общих IgM с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами против IgM человека.

Во время второй инкубации, связавшиеся IgM к ВГД взаимодействуют с добавленным в лунки рекомбинантным антигеном ВГД, конъюгированным с пероксидазой хрена.

После удаления несвязавшегося конъюгата, во время инкубации с раствором ТМБ, происходит окрашивание раствора в лунках. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации IgM к ВГД в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к IgM человека, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgM к ВГД, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgM к ВГД, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат рекомбинантного антигена ВГД с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл);

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

Принадлежности:

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления IgM к ВГД – соответствие результатов определения набором IgM к ВГД требованиям стандартного образца предприятия (СОП⁺) (рег. № 05-2-71), аттестованного ОБТК АО «Вектор-Бест»: титр СОП⁺ должен быть не менее 1:16. Титр СОП⁺ – наибольшее его разведение, при котором оптическая плотность в лунках с СОП⁺ больше либо равна величине критического значения оптической плотности ($ОП_{СОП^+} \geq ОП_{крит.}$).

3.2. Специфичность выявления IgM к ВГД – соответствие результатов определения набором IgM к ВГД требованиям стандартной панели предприятия (СПП⁻) (рег. № 05-2-72), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест», – составляет 100%: значения оптической плотности в лунках с образцами СПП⁻ меньше величины критического значения оптической плотности ($ОП_{СПП^-} < ОП_{крит.}$).

3.3. Диагностическая чувствительность выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита Дельта: клинические испытания, проведенные на 91 положительном образце сыворотки и плазмы крови, полученном от 41 пациента, показали 100% чувствительность (интервал 93–100%, с доверительной вероятностью 90%);

3.4. Диагностическая специфичность выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита Дельта: клинические испытания, проведенные на 225 отрицательных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 175 пациентов, показали 100% специфичность (интервал 98,3–100%, 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 клинко-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 Мин-здрава 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 прием 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 и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитар-

но-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- 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 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 10 до 5000 мкл;
- дозаторы полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 мкл до 350 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2 класса точности вместимостью 1000 мл;
- колба мерная вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата 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 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 заворачивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при $2-8^\circ\text{C}$ 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 всего 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.

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°C в течение срока годности набора.

7.5. Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток. Для этого внести в лунки вспомогательного планшета по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы), тщательно перемешать. При разведении сыворотки красный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

Хранение: не более 3 ч при температуре от 18 до 25°C.

7.6. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки после проведения ИФА утилизировать (*не сливать во флакон с исходным конъюгатом*).

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина

Раствор ТМБ готов к использованию.

Исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

Утилизировать раствор тетраметилбензидина, оставшийся в ванночке или флаконе после проведения ИФА (*не сливать во флакон с исходным раствором*).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые накопники. 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.

7.8. Подготовка стоп-реагента.

Стоп-реагент готов к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внесение контрольных и исследуемых образцов.

В две лунки стрипа, например, в А-1 и В-1, внести по 100 мкл K^- ; в одну лунку, например, С-1, – 100 мкл K^+ . В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (см. п. 7.5), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

Время внесения образцов не должно превышать 20 мин при использовании всех лунок планшета.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре $37 \pm 1^\circ C$.

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 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 цикла промывки.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. Внести во все лунки планшета по 100 мкл конъюгата.

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

Планшет заклеить пленкой и инкубировать 60 мин при $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

8.4. По окончании инкубации планшет промыть, как описано в п. 8.2.

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

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

Планшет инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°C .

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 значение оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОП_{ср. К⁻}).

Среднее значение ОП в лунках с К⁻ не должно превышать 0,25 ед. опт. плотности (о.е.)

Значение ОП в лунке с К⁺ должно быть не менее 1,0 о.е.

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

9.2. Вычислить критическое значение оптической плотности по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит.}} = \text{ОП}_{\text{ср. К}^-} + 0,2$$

9.3. Результат анализа **положительный**, если $\text{ОП}_{\text{обр.}} \geq \text{ОП}_{\text{крит.}}$, где ОП_{обр.} – оптическая плотность в лунке с исследуемым образцом.

Результат анализа **отрицательный**, если $\text{ОП}_{\text{обр.}} < \text{ОП}_{\text{крит.}}$.

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°C . Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.

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

10.3. Срок годности набора – 12 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°C в течение всего срока годности;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор тетраметилбензидина; конт-рольные образцы; конъюгат и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности;
- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 сут.

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

10.6. Для получения надежных 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 «Вектоген D-IgM»,
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

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

Антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации IgM к ВГД в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

1. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

- не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;
- ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;
- избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;
- рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);
- никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;
- перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протереть конус дозатора (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона;
- используйте только одноразовые наконечники для дозаторов;
- не обрабатывайте дезинфицирующими растворами и моющими средствами посуду (ванночки), используемую для работы с конъюгатом и раствором ТМБ;
- в случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой;
- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

- Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.
- Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.
- Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.
- Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.
- Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

2. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «Вектоген D-IgM»

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

- Внести:** по 100 мкл K^+ , K^- ;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочный раствор,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочный раствор,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны – 620–655 нм.

3. Графические символы

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до ...		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	yyyy-mm-dd yyyy-mm	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 363-57-86.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Промывочный		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистил. 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