

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для иммуноферментного количественного и качественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита А
(Вектогеп А-IgG)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Вектогеп А-IgG» (далее по тексту – набор) предназначен для количественного и качественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита А (IgG к ВГА) в сыворотке (плазме) крови человека и в препаратах крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор может быть использован в клинических и эпидемиологических исследованиях для диагностики гепатита А, для проведения предвакцинального скрининга и контроля эффективности вакцинации против вируса гепатита А.

1.3. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные образцы. Для исследования небольших партий проб возможны 4 независимые постановки ИФА по 24 анализа каждая, включая контрольные образцы (количественный вариант) либо 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контрольные образцы (качественный вариант).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения антител к ВГА основан на двухстадийном твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации происходит связывание специфических антител, содержащихся в исследуемых образцах, с иммобилизованным на поверхности лунок стрипов антигеном ВГА с образованием комплекса «антиген-антитело». На второй стадии связавшиеся IgG к ВГА взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител против IgG человека с пероксидазой хрена.

Комплекс «антиген–антитело–конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Степень окраски пропорциональна концентрации специфических антител в анализируемых образцах.

Концентрацию антител к ВГА в анализируемых образцах сывороток определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания IgG к ВГА в калибровочных образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном ВГА, готовый для использования – 1 шт.;

- калибровочный образец, не содержащий IgG к ВГА: 0 мМЕ/мл, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- калибровочные образцы, содержащие IgG к ВГА 50 мМЕ/мл; 100 мМЕ/мл; 200 мМЕ/мл – готовые для использования – 3 флакона (по 1,5 мл);
- калибровочный образец, содержащий IgG к ВГА 20 мМЕ/мл, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител против IgG человека, меченных пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 флакона (по 28,0 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночкой для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 4 – 200 мкл – 16 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфическая активность.

3.1.1. Специфичность: по результатам анализа сывороток стандартной панели предприятия, не содержащих IgG к ВГА (рег. № 05-2-206), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест», составляет 100%.

3.1.2. Чувствительность: по результатам анализа сывороток стандартной панели предприятия, содержащих IgG к ВГА (рег. № 05-2-206), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест», составляет 100%.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации по результатам определения содержания IgG к ВГА в одном и том же образце с использованием набора Вектогеп А-IgG не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации IgG к ВГА в образцах при их разведении имеет линейный характер в диапазоне концентраций от 20 до 200 мМЕ/мл и составляет 90–110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» IgG к ВГА - соответствие измеренной концентрации IgG к ВГА предписанной в образце, полученном путем смешивания равных объемов контрольного образца (не входит в состав набора) и калибровочного образца 20 мМЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Аналитическая чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация IgG к ВГА, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца 0 мМЕ/мл плюс 2s (среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения), не превышает 1,0 мМЕ/мл.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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 февраля 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113 (утвержденных 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 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.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

Для работы с набором необходимо следующее дополнительное оборудование и материалы:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $37 \pm 1^\circ C$;
- холодильник бытовой;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные и многоканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы вместимостью 15 мл;
- перчатки резиновые хирургические;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100, 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также образцы с признаками микробной контаминации.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до $8^\circ C$ не более 5 сут или при температуре минус $20^\circ C$ (и ниже) не более 3 мес.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки (плазмы) крови. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до $25^\circ C$.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов.

Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре от 18 до $25^\circ C$ не менее 60 мин.

7.2. Подготовка планшета

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

Оставшиеся неиспользованными стрипы хранить при от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.3. Подготовка калибровочных образцов

Калибровочные образцы готовы к использованию.

Перед проведением анализа флаконы с калибровочными образцами встряхнуть.

Калибровочные образцы хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.4. Предварительное разведение исследуемых образцов.

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, 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 образца меняется незначительно.

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

7.5. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30-40°C до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

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

7.6. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

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

Оставшийся после проведения ИФА раствор конъюгата утилизировать (*не сливать во флакон с исходным конъюгатом*).

Конъюгат хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

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

Раствор ТМБ хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

Оставшийся после проведения ИФА раствор тетраметилбензидина утилизировать (*не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ*).

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

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

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

7.8. Внесение контрольных и исследуемых образцов.

Для постановки **качественного** варианта анализа в лунку А-1 внести 100 мкл калибровочного образца 0 мМЕ/мл, в лунки В-1, С-1 – по 100 мкл калибровочного образца 20 мМЕ/мл, в лунку D-1 – 100 мкл калибровочного образца 200 мМЕ/мл.

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов.

Для постановки **количественного** варианта анализа внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 100 мкл калибровочных образцов 0; 20; 50; 100; 200 мМЕ/мл.

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов в дублях.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение 10 мин при использовании всех лунок планшета.

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37°C.

7.10. 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. 7.5.), 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.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см п. 7.6.).

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

7.12. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37°C.

7.13. По окончании инкубации промыть планшет 5 раз как описано выше (см. п. 7.10.).

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

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

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить оптическую плотность в лунках с помощью спектрофотометра: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение оптической плотности на одной длине волны – 450 нм.

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Качественное определение IgG к ВГА.

9.1.1. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

– $B_0 \leq 0,1$ ед. опт. плотн., где B_0 – значение оптической плотности в лунке с калибровочным образцом 0 мМЕ/мл;

– $B_{200} \geq 2,0$ ед. опт. плотн., где B_{200} – значение оптической плотности в лунке с калибровочным образцом 200 мМЕ/мл;

9.1.2. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с калибровочным образцом 20 мМЕ/мл ($ОП_{20}$).

Результат анализа считают **положительным**, если значение ОП анализируемого образца равно или превышает величину $ОП_{20}$.

Результат анализа считают **отрицательным**, если значение ОП анализируемого образца ниже ОП₂₀.

9.2. Количественное определение IgG к ВГА.

9.2.1. Вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с калибровочными образцами. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации IgG к ВГА в калибровочных образцах (мМЕ/мл).

9.2.2. Определить содержание IgG к ВГА в анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.2.3. Если значение ОП анализируемого образца превышает ОП калибровочного образца 200 мМЕ/мл, следует повторить анализ, разведя образец в 10 раз.

Для этого в лунке планшета для предварительного разведения образцов к 90 мкл РПРС добавить 10 мкл анализируемой сыворотки, тщательно перемешать (разведение 1:10). Затем к 90 мкл РРС добавить 10 мкл разведенной 1:10 сыворотки, тщательно перемешать (разведение 1:100). Далее, согласно п. 7.8. данной инструкции, в лунку планшета с иммобилизованным антигеном ВГА внести 90 мкл РРС и 10 мкл разведенной 1:100 сыворотки. Таким образом, исследуемая сыворотка разбавляется в лунке в 1000 раз.

Если при разведении в 1000 раз ОП сыворотки вновь превышает концентрацию калибровочного образца 200 мМЕ/мл, то необходимо исследовать данный образец повторно в разведениях 1:10 000, 1:100 000 и т.д.

При подсчете концентрации необходимо учесть фактор разведения, т.е. умножить полученный результат на соответствующий коэффициент.

9.2.4. Если концентрация IgG к ВГА в анализируемом образце менее 20 мМЕ/мл, результат оценивают как отрицательный.

Если концентрация IgG к ВГА в анализируемом образце 20 мМЕ/мл и более, результат оценивают как положительный. Содержание в сыворотке IgG к ВГА в концентрации 20 мМЕ/мл и более обеспечивает защитный эффект от заражения ВГА.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

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

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов «Вектогеп А-IgG» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. 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 набора;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- раствор тетраметилбензида после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- калибровочные образцы, конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- раствор для предварительного разведения сывороток, раствор для разведения сывороток хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 сут.

10.4. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

10.5. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес, допускается однократное замораживание–размораживание образцов сыворотки крови.

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

10.7. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор для предварительного разведения сывороток), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

11. КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

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

630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. /факс (383) 363-13-46,
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.

Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности.

Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

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

1. Гарантийные обязательства

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

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.

2. Обеспечение безопасности персонала

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать в соответствии п. 4.7 настоящей инструкции и согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998).

Таблица расхода компонентов набора реагентов

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

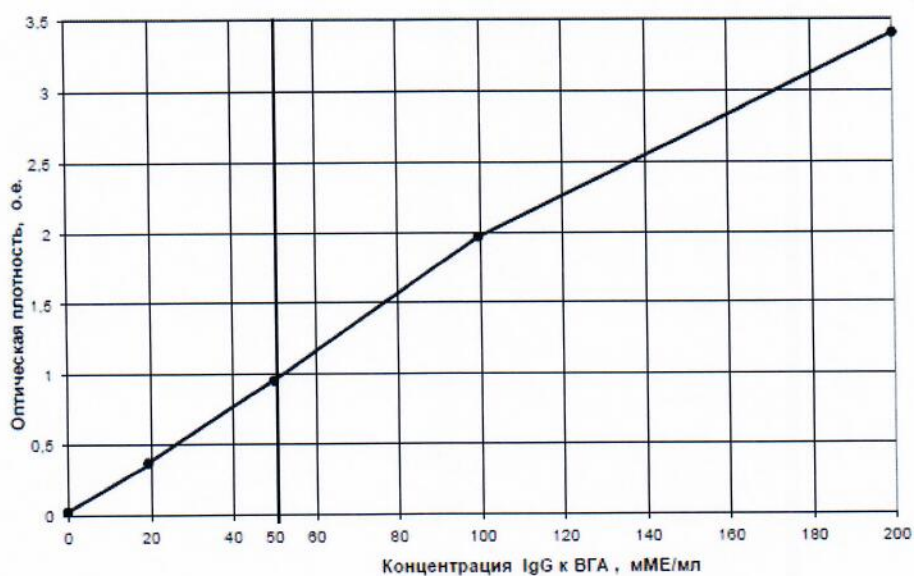


Рис. Зависимость оптической плотности от концентрации IgG к ВГА в калибровочных образцах