«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«13» _____ 2022 г.
М.П.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для иммуноферментного выявления суммарных антител к вирусу
гепатита Дельта
(Вектоген D-антитела)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Вектоген D-антитела» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления суммарных антител к вирусу гепатита Дельта (ВГД) в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе.

Исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованным антигеном в присутствии конъюгата – моноклональных антител к вирусу гепатита Дельта, конъюгированных с пероксидазой хрена. При этом происходит конкурентное связывание антител к вирусу гепатита Дельта, присутствующих в исследуемых образцах, и антител в вирусу гепатита Дельта, входящих в состав конъюгата, с антигеном вируса гепатита Дельта, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок. Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках. Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна количеству антител к вирусу гепатита Дельта, содержащихся в исследуемом образце.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигеном ВГД, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец ($К^+$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий суммарные антитела к ВГД, готовый для использования –1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец ($К^-$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий суммарные антитела к ВГД, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к ВГД с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС), готовый для использования – 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).

Набор дополнительно комплектуется:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
– ванночками для реагента – 2 шт.;
– наконечниками для пипеток на 4–200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность по стандартному образцу предприятия, СОП$^{+}$, содержащему суммарные антитела к вирусу гепатита Дельта, титр не менее 1:320.

3.2. Специфичность по стандартной панели сывороток предприятия, не содержащих суммарные антитела к вирусу гепатита Дельта, СПП$^{-}$, 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При подготовке к проведению анализа следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

– работать в резиновых перчатках;
– не пипетировать растворы ртом;
– все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113.

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

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм–650 нм;
– термостат, поддерживающий температуру 37±1°С;
– промывочное устройство для планшетов;
– холодильник бытовой;
– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,5 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
– перчатки медицинские диагностические одноразовые;
– бумага фильтровальная лабораторная;
– флаконы вместимостью 15 мл;
– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;
– вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации. Полученные образцы можно замораживать/оттаивать только один раз, т.к. повторное замораживание/оттаивание может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать. Замороженные образцы хранить при температуре минус 20°С (и ниже) не более 6 мес.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°С.

6.4. Для отбора исследуемых образцов и компонентов набора реагентов использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Внимание! *Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.*

– Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 60 мин при температуре (18–25)°С.

– Сразу после постановки реакции неиспользованный планшет и плотно закрытые флаконы с исходными компонентами необходимо поместить в холодильник (2–8)°С.

– Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

– При промывке лунки планшета заполнять полностью *(400 мкл промывочного раствора).* Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

– Необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов промывочного устройства: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю емкость для промывочного раствора и шланги следует промывать 70% спиртом.

– Не допускать высыхания лунок между отдельными операциями.

– 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 во всех наборах АО «Вектор-Бест».

– При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

– Ванночки, используемые для работы с конъюгатом и раствором ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

– В случае повторного использования ванночки для конъюгата промыть дистиллированной водой; ванночки для раствора ТМБ сразу после работы промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

– Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих 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 (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

– Пипетки и рабочие поверхности во время проведения ИФА обрабатывать 70% раствором этилового спирта. Не использовать во время проведения ИФА перекись водорода, хлорамин и т.д.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.2. Подготовка планшета

Непосредственно перед использованием вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов; остальные стрипы снять с рамки и немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Стрипы могут быть использованы в течение всего срока годности набора после первого вскрытия пакета при условии их хранения при температуре от 2 до 8°С.

7.3. Приготовление положительного и отрицательного контрольных образцов

Положительный и отрицательный контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительных разведений.

После отбора части содержимого тщательно укупоренные флаконы хранить при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.4. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой (см. таблицу расхода реагентов). При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°С до полного растворения осадка.

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

7.5. Приготовление конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода реагентов) в чистый флакон

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество конъюгата.

После отбора части содержимого тщательно укупоренный флакон хранить при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.6. Приготовление раствора тетраметилбензидина

Раствор тетраметилбензидина готов к использованию.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода реагентов) в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество раствора тетраметилбензидина.

После отбора части содержимого тщательно укупоренный флакон хранить при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.7. Стоп-реагент готов к использованию.

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

7.8. Внесение контрольных образцов и исс-ледуемых сывороток.

В любые две лунки внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца ($К^-$), в одну лунку – 100 мкл положительного контрольного образца ($К^+$).

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл цельных исследуемых сывороток, тщательно перемешать, при этом цвет раствора меняется с фиолетового на синий. Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 10 раз.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок планшета.

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

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

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

7.10. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 60 мин при температуре (37±1)°С.

7.11. 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 (см. 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.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл раст-вора тетраметилбензидина (см. п. 7.6), инкубировать в темноте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°С.

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

Остатки раствора тетраметилбензидина из ванночки утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным раствором тетраметилбензидина!).***

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Измерение проводить не позднее 5 мин после остановки реакции.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательными контрольными образцами ($ОП_{ср.}К^-$).

9.2. Результаты исследований следует учитывать при соблюдении следующих условий:

9.2.1. Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не более 0,40.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.2.2. Значение оптической плотности в лунке с отрицательным контрольным образцом должно быть не менее 1,50.

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

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср.}(К^{-}) / 2,$$

где $ОП_{ср.}(К^{-})$ – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом.

9.4. Результат анализа считать **положительным**, если $ОП_{обр.} \leq ОП_{крит.}$.

Результат анализа считать **отрицательным**, если значение $ОП_{обр.} > ОП_{крит.}$.

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

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности (12 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в пределах срока годности.

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;
- положительный, отрицательный контрольные образцы; конъюгат; раствор тетраметилбензидина хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток и стоп-реагент 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.

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

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

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

По вопросам, касающимся качества набора «Вектогеп D-антитела», следует обращаться в АО «Вектор-БЕСТ» по адресу:

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64,
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 суммарных антител к вирусу гепатита Дельта 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 компонентами набора

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 пораженный участок промыть большим количеством проточной воды.*

Обращение с исследуемыми образцами

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 клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

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

Порядок утилизации или уничтожения компонентов набора

При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиНом 2.1.7.2790-10 «Санитарно-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».

3. 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 чистые одноразовые наконечники для каждого реа-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

гента, контроля, образца;

– никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

– перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протереть конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона;

– 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.

– 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.

4. Оценка анализа по коэффициенту позитивности

Результаты анализа можно оценить по коэффициенту позитивности (**КП**), рассчитывая отношение ОП в лунке с образцом пациента
относительно $ОП_{крит.}$ (п. 9.3).

Для расчета коэффициента позитивности образцов использовать следующую формулу:

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

Результат анализа **положительный**, если $КП_{обр.} \leq 1$, где $КП_{обр.}$ – коэффициент позитивности исследуемого образца.

Результат анализа **отрицательный**, если $КП_{обр.} > 1$.

Расчет КП целесообразно проводить для оценки концентрации антител к ВГД в исследуемых образцах и при наблюдении за изменением концентрации специфических суммарных антител в динамике в парных образцах сывороток.

5. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «Вектоген D-антитела»

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести:	100 мкл $К^+$ и $К^-$; по 90 мкл РРС и по 10 мкл исс-ледуемых образцов.
Внести:	по 100 мкл конъюгата.
Инкубировать:	60 мин, 37°С.
Промыть:	промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
Внести:	по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.
Инкубировать:	25 мин, 18–25°С в темноте.
Внести:	по 100 мкл стоп-реагента.
Измерить:	ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Графические символы

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ/n	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов	NON STERILE	Не стерильно
LOT	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	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т, концентрат, мл	Вода дистил., 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru