УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«___» _____ 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита Е

(Вектоген Е-IgG)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита Е «Вектоген Е-IgG» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G (IgG) к вирусу гепатита Е (ВГЕ) в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Для исследования небольшой партии проб возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения IgG к ВГЕ основан на твердофазном непрямом иммуноферментном анализе с использованием рекомбинантных антигенов вируса гепатита Е.

Во время первой инкубации происходит связывание иммуноглобулинов к ВГЕ с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок рекомбинантными антигенами вируса гепатита Е.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией И.Н. Кувшиновой, ст. научным сотрудником Б.Г. Некрасовым

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

Во время второй инкубации связавшиеся иммуноглобулины класса G к ВГЕ взаимодействуют с моноклональными антителами против IgG человека, меченными пероксидазой хрена. После удаления избытка несвязавшегося конъюгата, во время инкубации с раствором ТМБ, происходит окрашивание раствора в лунках.

Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации иммуноглобулинов класса G к ВГЕ в анализируемом образце.

2.2. Состав набора

В состав набора входят следующие реагенты:

– планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок рекомбинантными антигенами вируса гепатита Е, готовый для использования – 1 шт.;

– положительный контрольный образец ($К^+$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий IgG к ВГЕ, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);

– отрицательный контрольный образец ($К^-$) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к ВГЕ, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);

– конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);

– концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);

– раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12,0 мл);

– раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);

– стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

Принадлежности:

– пленка 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 ВГЕ – соответствие результатов определения набором IgG к ВГЕ требованиям стандартной панели предприятия образцов сывороток крови, содержащих иммуноглобулины класса G к вирусу гепатита Е (СПП ВГЕ – IgG, рег. № 05-2-81), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%.

3.2. Специфичность выявления IgG к ВГЕ – соответствие результатов определения набором IgG к ВГЕ требованиям стандартной панели предприятия образцов сывороток крови, не

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

содержащих иммуноглобулины класса G к вирусу гепатита Е (СПП ВГЕ – IgG, рег. № 05-2-81), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита Е: клинические испытания, проведенные на 123 положительных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 73 пациентов, показали 100 % чувствительность (интервал 96,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита Е: 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 2б (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 клинико-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».

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.

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

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 «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».

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

– 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; допускается измерение только при длине волны 450 нм;

– термостат, поддерживающий температуру (37±1)°С;

– холодильник бытовой;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– дозаторы полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5-5000 мкл (погрешность не более 5%);

– дозаторы полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 до 300 мкл (погрешность не более 5%);

– промывочное устройство для планшетов;

– перчатки медицинские диагностические одноразовые;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

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

6.2. Для проведения анализа можно использовать образцы плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия, ЭДТА.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 6 месяцев.

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 минут при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку, вынуть все компоненты и выдержать их при температуре от 18 до 25 °С не менее 1 часа.

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.

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

7.3. Приготовление промывочного раствора.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объёма 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 суток.

7.4. Подготовка положительного и отрицательного контрольных образцов.

Положительный и отрицательный контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

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

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

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

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего 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 реагента необходимое количество раствора ТМБ.

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

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего 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
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

7.7. Подготовка стоп-реагента.

Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

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

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. В лунки А-1, В-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца ($К^-$).

В лунку С-1 внести 100 мкл положительного контрольного образца ($К^+$).

Внимание! *Перед использованием РРС флакон с раствором следует тщательно встряхнуть.*

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Тщательно перемешать, при этом цвет раствора меняется с фиолетового на синий. Таким образом, исследуемые образцы в лунках разбавляются в 10 раз.

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

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

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 аспирацией 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 конъюгата (п.7.5). Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

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

8.6. По окончании инкубации промыть планшет как описано в п. 8.3.

8.7. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (п.7.6). Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

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

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

18 до 25 °С.

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

8.9. Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм; допускается измерение только 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.

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

$$ОП_{крит} = ОП_{ср.}К^{-} + 0,2,$$

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

9.3. Оценка результатов:

– среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,2 ед. опт. плотн. ($ОП_{ср.}К^{-} \leq 0,2$);

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,6 ед. опт. плотн. ($ОП\ К^{+} \geq 0,6$).

9.4. Только при соблюдении положений п. 9.3 можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов.

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

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

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ 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

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

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 набора;

– концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином; раствор для разведения сывороток; 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 набора;

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

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

10.6. 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».

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.

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

АО «Вектор-Бест» по адресу:
630559, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Кольцово, а/я 121, тел. тел. (383) 227-67-64, 227-75-40.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

С.н.с. лаборатории маркеров
вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест» Б.Г. Некрасов

Зав. лабораторией маркеров
вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест» И.Н Кувшинова

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест» М.Ю. Рукавишников

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор Т.И. Поспелова
м.п.

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



Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.
Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

_____ Захарова Л.Н.
"3" мая 2017 г.

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