

ІНСТРУКЦІЯ
з використання набору реагентів
ВГА-антиген-Бест

Набір реагентів для імуноферментного виявлення антигену вірусу гепатиту А

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «ВГА-антиген-Бест» призначений для виявлення антигену вірусу гепатиту А (ВГА) методом твердофазного імуноферментного аналізу в вірусосодержащим культуральних рідинах при лабораторних дослідженнях, в екстрактах фекалій при клінічних дослідженнях, в воді.

3. АНАЛІТИЧНІ І ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналітична чутливість - 100%.

Діагностична специфічність - 100%.

4. СКЛАД НАБОРУ

- планшет розбірний з іммобілізованими моноклональними антитілами до ВГА - 1 шт;
- позитивний контрольний зразок, інактивованій (К+, прозора рідина червоного кольору) - 1.
- негативний контрольний зразок (К-, прозора рідина жовтого кольору) - 1. Фл,
- кон'югат (моноклональні антитіла до ВГА, мічені пероксидазою хрому; Концентрат - 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату (РРК, безбарвна рідина з легкою опалесценцією) - 1 фл
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Т × 25, безбарвна прозора рідина, можливо випадання осаду солей) - 2 фл.
- фосфатно-сольовий буферний розчин (25 × ФСР, безбарвна прозора рідина, можливо випадання осаду солей), концентрат - 1 фл.;
- субстратний буферний розчин (СБР, безбарвна прозора рідина) - 1 фл.;
- тетраметілбензидін, концентрат (ТМБ; прозора безбарвна або світло-жовтого кольору рідина) - 1 фл,
- стоп-реагент (безбарвна прозора рідина) - 1 фл.

Примітки. набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не піпетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

6. СПОСІБ ЗАСТОСУВАННЯ

Для виявлення антигену ВГА в фекаліях попередньо готують екстракт на 20%-ої суспензії фекалій (п. 8.9.). Досліджують надосадову рідину.

При дослідженні екстрактів фекалій слід враховувати особливості екскреції ВГА хворим. Виділення вірусу гепатиту А в зовнішнє середовище відбувається як в інкубаційний період, так і протягом 3 тижнів жовтяничного періоду. При цьому на пізній стадії інкубаційного періоду і в продроме в фекаліях антиген ВГА визначається у 100% хворих, на першому тижні жовтяничного періоду - у 50% хворих, на другому тижні - у 20%, і на третьому тижні - у 5% хворих. Іншою особливістю екскреції ВГА хворими є певна циклічність виділення вірусу, що полягає в чергуванні антиген-містять і антиген-несодержащих зразків фекалій. У зв'язку з цим забір зразків і визначення ВГА в одного хворого необхідно проводити кілька днів поспіль (мінімум 3 дні).

Для виявлення антигену ВГА у воді необхідно провести попереднє концентрування вірусу з використанням відомих методів концентрування, дозволених для санітарного контролю водних об'єктів.

7. ОБЛАДНАННЯ І МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПРИ РОБОТІ З НАБОРОМ:

Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5-3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

8. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗА

8.1. Перед роботою витягти набір з холодильника, розкрити упаковку і витримати всі компоненти набору, в тому числі і запечатаний пакет з планшетом, при температурі від 18 до 25 ° С не менше 60 хв.

8.2. ПРАВИЛА РОБОТИ ПРИ ДРОБОВОМУ ВИКОРИСТАННІ НАБОРУ

8.2.1. Розчини з флаконів відбирати тільки одноразовими індивідуальними наконечниками для піпеток.

8.2.2. Після першого розкриття флакони відразу щільно закрити кришками, помістити в холодильник і зберігати при температурі 2-8 ° С протягом всього придатності набору.

8.3. ПІДГОТОВКА ПЛАНШЕТ

Розкрити пакет вище замку і встановити на рамку необхідне для проведення аналізу кількість стрипів. Решта невикористані стрипи негайно помістити знову в пакет з вологопоглиначем, видалити з нього повітря, щільно закрити замок і помістити в холодильник.

Зберігання: при температурі від 2 до 8 ° С протягом усього терміну придатності набору.

8.4. ПІДГОТОВКА КОНТРОЛЬНИХ ЗРАЗКІВ

Контрольні зразки готові до використання і не вимагають додаткового розведення.

8.5. ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧОГО РОЗЧИНУ ФСБ-Т

Робочий розчин ФСБ-Т приготувати розведенням вихідного концентрату фосфатно-сольового буферного розчину з твіном в 25 разів. Для цього відповідно до числа використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів) внести в мірний циліндр необхідну кількість концентрату ФСБ-Т і довести до відповідного об'єму дистильованою водою.

При випаданні осаду солей в концентраті необхідно прогріти його при температурі від 30 до 40 ° С до повного розчинення осаду.

Зберігання: не більше 5 діб при температурі 2-8 ° С.

Таблиця витрати компонентів набору реагентів

К-ть використаних стрипів	Робочий розчин кон'югату		Розчин ТМБ, мл		Промивальний розчин	
	Концентрат кон'югату (мл)	РРК(мл)	ТМБ, концентрат (мл)	СБР (мл)	ФСБТ, концентрат, мл	Дистил. вода, мл
1	0.1	1,0	0.05	1,0	2,0	до 50
2	0.2	2,0	0.10	2,0	4,0	до 100
3	0.3	3,0	0.15	3,0	6,0	до 150
4	0.4	4,0	0.20	4,0	8,0	до 200
5	0.5	5,0	0.25	5,0	10,0	до 250
6	0.6	6,0	0,30	6,0	12,0	до 300
7	0.7	7,0	0,35	7,0	14,0	до 350
8	0.8	8,0	0,40	8,0	16,0	до 400
9	0.9	9,0	0,45	9,0	18,0	до 450
10	1,0	10,0	0,50	10,0	20,0	до 500
11	1,1	11,0	0,55	11,0	22,0	до 550
12	1,2	12,0	60,00	12,0	24,0	до 600

8.6. Приготування робочого фосфатно-сольовий розчину

Вміст флакона з концентратом ФСР додати до 480 мл дистильованої води, ретельно перемішати.

У разі дробового використання концентрат ФСР слід розводити дистильованою водою у співвідношенні 1:24 (1 частина концентрату на 24 частини дистильованої води).

При випаданні осаду солей в концентраті необхідно прогріти його при температурі від 30 до 40 ° С до повного розчинення осаду.

Зберігання: не більше 5 діб при температурі 2-8 ° С.

8.7. Приготування робочого розчину кон'югата.

Залежно від числа використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів) в окремий чистий флакон або в пластикову ванночку для реагенту внести необхідну кількість розчину для розведення кон'югату (РРК), додати відповідну кількість концентрату кон'югату, ретельно перемішати.

Зберігання: до 3:00 при 18-25 ° С.

8.8. Приготування робочого розчину тетраметілбензидіна.

Увага! Рекомендується виділити наконечники для піпеток, які використовувати тільки для роботи з тетраметілбен-зидіном. Посуд і наконечники для піпетки, що контактують з розчином ТМБ, не можна відмивати із застосуванням синтетичних миючих засобів, оскільки навіть їхні сліди ведуть до неконтрольованого розкладання ТМБ в ході реакції. Після роботи посуд і наконечники обполоснути водою, промити 70% етиловим спиртом і ретельно відмити дистильованою водою.

Відповідно до числом використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів) в окремий чистий

флакони або в пластикову ванночку для реагенту внести необхідну кількість СБР, додати відповідну кількість концентрату ТМБ, ретельно перемішати.

Припустимо блакитне забарвлення робочого розчину ТМБ, яке не впливає на результати аналізу.

Зберігання: не більше 3:00 при 18-25 ° С в темряві.

8.9. ПІДГОТОВКА АНАЛІЗОВАНИХ ЗРАЗКІВ

8.9.1. Підготовка зразків фекалій

Для виявлення антигену ВГА в фекаліях приготувати екстракт 20%-ної суспензії фекалій. Для цього зразки фекалій в кількості 1 г зібрати в стерильні флакони з пробкою місткістю 10 мл (приблизно ¼ флакона). Додати по 5,0 мл робочого розчину ФСР (п.8.6.), Струшувати до отримання гомогенної суспензії, після чого центрифугувати при 3000 об / хв протягом 30 хв. Дослідити надосадову рідину. Для виявлення антигену ВГА в фекаліях можна використовувати як свіжо приготований зразок, так і зберігався при температурі 2-8 ° С протягом 24 годин або при мінус 20 ° С протягом 3 місяців.

8.9.2. Підготовка зразків води

Для виявлення антигену ВГА у воді необхідно провести попереднє концентрування вірусу з використанням відомих методів концентрування, дозволених для санітарного контролю водних об'єктів.

При використанні дрібнодисперсних сорбентів для концентрування вірусу необхідно надалі ретельно видалити із зразків сорбент, наприклад, за допомогою високошвидкісного центрифугування.

Після елюції зразка з сорбенту або трекової мембрани перед постановкою його в ІФА необхідно довести рН розчину (проби) до значення 7,2-7,4.

Перед постановкою в ІФА елюатів не можна піддавати обробці хлороформом, дезінфікуючими засобами, бактеріостатиків. Для видалення бактеріальної мікрофлори рекомендується використовувати тільки фільтрацію через стерилізують мембрани.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗА

9.1. Контрольні зразки внести за такою схемою:

- 1 лунка - 100 мкл К +;
- 2 лунки - по 100 мкл К-.

У всі інші лунки внести по 100 мкл підготовлених досліджуваних зразків (п. 8.9.).

Відрізати липку плівку необхідного розміру. Стрип закрити, щільно притиснувши плівку. Інкубувати в термостаті 90 хв при температурі 37 ° С або 60 хвилин при температурі 37 ° С в термошейкер орбітального типу з інтенсивністю перемішування 700 об / хв.

9.2. Після закінчення інкубації зняти липку плівку і помістити її в посудину з дезінфікуючим розчином. Вміст лунок видалити в посудину з дезінфікуючим розчином і промити лунки планшета 5 раз робочим розчином ФСБ-Т (п. 8.5.) За допомогою промивного пристрою. При цьому в кожен лунку вносити не менш 400 мкл рідини в процесі одного промивання. Час між заповненням і спороженням лунок повинно бути не менше 30 сек. Необхідно стежити за повним спороженням лунок після кожного циклу відмивання. Після закінчення промивання залишки вологи з лунок ретельно видалити, постукуючи перевернутим планшетом по фільтрувальному папері.

9.3. У всі лунки внести по 100 мкл робочого розчину кон'югата (п. 8.7.). Планшет заклеїти липкою плівкою і інкубувати в термостаті протягом 60 хв при температурі 37 ° С або 30 хвилин при температурі 37 ° С в термошейкер орбітального типу з інтенсивністю перемішування 700 об / хв. Для внесення робочого розчину кон'югату використовувати пластикову ванночку і одноразові наконечники, що входять до складу набору.

9.4. Після закінчення другої інкубації видалити вміст лунок і промити планшети 5 разів так, як зазначено в п. 9.2.

9.5. Внести в усі лунки планшета по 100 мкл робочого розчину ТМБ (п. 8.8.). Планшет помістити в захищене від світла місце і витримати протягом 25 хв при температурі 18-25 ° С.

Для внесення робочого розчину ТМБ використовувати пластикову ванночку і одноразові наконечники, що входять до складу набору.

9.6. Зупинити реакцію додаванням в лунки по 100 мкл стоп-реагенту.

Увага! У разі потрапляння на шкіру розчину ТМБ або стоп-реагенту необхідно негайно змити їх великою кількістю проточної води.

9.7. Виміряти величину оптичної густини розчинів в лунках на спектрофотометрі в двоххвильовому режимі: основний фільтр - 450 нм, референс-фільтр - в діапазоні 620-650 нм. Допустима також реєстрація тільки з фільтром 450 нм. Вимірювання проводити через 2-3 хвилин після зупинки реакції. Час між зупинкою реакції і вимірюванням оптичної густини не повинно перевищувати 5 хв.

10. КОРОТКА СХЕМА ІФА

Використовувати тільки після уважного ознайомлення з інструкцією!

10.1. Термошейкер

Внести: по 100 мкл К +, К-, по 100 мкл аналізованих зразків.

Інкубуйте: 60 хв, 37 ° С, 700 об / хв.

Промити: робочим розчином ФСБ-Т, 400 мкл, 5 разів.

Внести: по 100 мкл робочого розчину кон'югату.

Інкубуйте: 30 хв, 37 ° С, 700 об / хв.

Промити: робочим розчином ФСБ-Т, 400 мкл, 5 разів.
Внести: по 100 мкл робочого розчину тетраметілбензідіна.
Інкубуйте: 25 хв, 18-25 ° С, в темряві.
Внести: по 100 мкл стоп-реагенту.
Виміряти: ОГ при 450 нм / референсна довжина хвилі 620-650 нм.

10.2. ТЕРМОСТАТ

Внести: по 100 мкл К +, К-, по 100 мкл аналізованих зразків.
Інкубуйте: 90 хв, 37 ° С.
Промити: робочим розчином ФСБ-Т, 400 мкл, 5 разів.
Внести: по 100 мкл робочого розчину кон'югату.
Інкубуйте: 60 хв, 37 ° С.
Промити: робочим розчином ФСБ-Т, 400 мкл, 5 разів.
Внести: по 100 мкл робочого розчину тетраметілбензідіна.
Інкубуйте: 25 хв, 18-25 ° С, в темряві.
Внести: по 100 мкл стоп-реагенту.
Виміряти: ОГ при 450 нм / референсна довжина хвилі 620-650 нм.

11. РОЗРАХУНКИ І ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

11.1. Розрахувати середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках з негативним контрольним зразком (ОГ_{ср.К-}). Середнє значення оптичної густини в лунках з негативним контрольним зразком повинно бути не більше 0,20. Значення оптичної густини в лунці з позитивним контрольним зразком повинно бути не менше 0,50.

11.2. Тільки при дотриманні умов п. 11.1. можна враховувати результати, отримані для досліджуваних зразків. Обчислити критичне значення оптичної густини (ОГ_{крит}) за формулою:

$$\text{ОГ}_{\text{крит}} = \text{ОГ}_{\text{ср}}(\text{К-}) + 0,15$$

11.3. Результат аналізу вважають позитивним, якщо $\text{ОГ}_{\text{обр.}} \geq \text{ОГ}_{\text{крит}}$, де $\text{ОГ}_{\text{обр.}}$ - Оптична густина досліджуваного зразка. Результат аналізу вважають негативним, якщо $\text{ОГ}_{\text{обр.}} < \text{ОГ}_{\text{крит}}$.

12. ПРОВЕДЕННЯ ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТИТРИ ВГА У ПОЗИТИВНИХ ЗРАЗКАХ

Для визначення титру вірусу в досліджуваних позитивних зразках необхідно провести титрування даних проб. Для цього внести в лунку А-1100 мкл К +, в дві інші лунки (В-1, С-1) внести по 100 мкл К-.

В інші лунки верхнього горизонтального ряду внести по 200 мкл досліджуваних зразків, в лунки нижченаведених рядів внести по 100 мкл робочого розчину ФСР (п. 8.6.). Багатоканальною піпеткою перенести по 100 мкл тестованих проб з лунок верхнього ряду в лунки нижнього ряду, вміст лунок ретельно перемішати. Таким чином продовжити послідовне 2х-кратне титрування до останнього ряду. З лунок останнього ряду після перемішування відібрати по 100 мкл і скинути в дезінфікуючий розчин.

Стрипи заклеїти плівкою і інкубувати 90 хв при 37 ° С або 60 хв при 37 ° С на термошейкер орбітального типу з інтенсивністю перемішування 700 об / мін.

Подальший хід аналізу аналогічний описаному в поп.9.2-9.7.

Титр вірусу визначають за найбільшою розведення зразка, оптична густина якого у відповідній лунці більше або дорівнює ОГ_{крит} ..

ЗБЕРІГАННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ

Набори зберігати і транспортувати при (2-8)°С. Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 10 діб.

Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися в ТОВ «Бест Діагностик» за адресою:

04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9,

тел./факс: (044) 500-57-11

e-mail: info@bestdiagnostic.com.ua

Виробник залишає за собою право вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.