

ІНСТРУКЦІЯ
з використання набору реагентів

«HBsAg-скрин-БЕСТ»

Тест-система імуноферментна для виявлення та підтвердження вмісту поверхневого антигену вірусу гепатиту В

1. Призначення

Набір реагентів «HBsAg-скрин-БЕСТ» (далі за текстом - набір) призначений для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) в сироватці / плазмі крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

Один набір розрахований на проведення: (комплект 1) - 96 аналізів, (комплект 2) - 192 аналізи, (комплект 3) – 480 аналізів включаючи контролю. Всі набори стрипової комплектації. Набір адаптований для постановки ІФА на імуноферментних аналізаторах відкритого типу («TECAN SUNRISE», виробник «TECAN», «PR-2100», виробник «BIO-RAD», «MULTISCAN», виробник «Labsystems»,).

2. Аналітичні і діагностичні характеристики

Аналітична чутливість що визначається за допомогою набору - 0,05 МЕ/мл.
Діагностична специфічність - 100%.

3. Принцип аналізу

Принцип аналізу тест-системи «HBsAg-скрин-БЕСТ» базується на одностадійному варіанті імуноферментного аналізу.

4.Склад набору (з розрахунку на 1 планшет)

- планшет розбірний з імобілізованими моноклональними антитілами до HBsAg - 1 шт.;
- позитивний контрольний зразок, інактивованій (K+), рекомбінантний HBsAg, рожевий відтінок - 1 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивованій (K-), рідина з жовтим відтінком – 2 фл.;
- кон'югат, антитіла до HBsAg, мічені пероксидазою хрому; (рідина синього кольору) – 1 фл.;
- розчин для промивання, концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Тх20) – 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату (РПК) рожевий відтінок – 1 фл.;
- тетраметілбензидін, (ТМБ) розчин ТМБ-субстрату – 1 фл.,
- стоп-реагент – 1 фл.;
- Набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів, бланк внесення проб.

5. Матеріали та обладнання

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.

6. Запобіжні заходи

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.

7. Підготовка зразків

Зразки до дослідження можна зберігати не більше 7 діб при температурі від 2 до 8 С і 3 міс при температурі мінус 20 С або нижчою. Допускається тільки одноразове заморожування-розморожування зразків. Розморожені зразки перед дослідженням ретельно перемішати.

Не допускається використання для дослідження зразків з підвищеним вмістом ліпідів і (або) з ознаками гемолізу, і (або) з видимим мікробним проростанням.

Зразки, що містять осад, перед аналізом відцентрифугувати протягом 10-15 хв при 2500-3000 об / хв.

8. Підготовка реагентів

Перед роботою витягти набір з холодильника, розкрити упаковку і витримати всі реагенти перед проведенням аналізу не менше 30 хв при температурі від 18 до 25 С.

8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та зберігайте щільно закритим при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Розчин для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

8.3. Розчин кон'югату

Робоче розведення кон'югату готується наступним чином:

Розведіть концентрат кон'югату 11х (синій) у чистому флаконі розчином для розведення кон'югату (рожевий) у співвідношенні 1:11 (тобто, 1+10), розчин забарвлюється у фіолетовий колір. Наприклад, для 8 лунок аналізу достатньо додати до 500 мкл розчину для розведення кон'югату 50 мкл концентрату кон'югату.

Розчин кон'югату в робочому розведенні стабільний протягом доби за умови зберігання при 2-8°C.

9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити Бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.2.

9.4. Приготувати розчин кон'югату згідно пункту 8.3.

9.5. Внести в лунки по 100 мкл контролів та досліджуваних зразків: в лунку А1 – позитивний контроль, в лунки В1, С1 та D1 – негативний контроль, в лунку Е1 та решту лунок – досліджувані зразки.

9.6. Поверх контролів та досліджуваних зразків внести в лунки по 50 мкл розчину кон'югату. Для запобігання кросконтaminaції зразків кон'югат слід вносити не торкаючись сироваток в лунках. Обережно постукуючи по планшету, перемішати суміш в лунках.

9.7. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 120 хвилин при температурі 42°C в статичному режимі або при температурі 37°C і постійному орбітальному перемішуванні вмісту лунок із швидкістю 300 об/хв.

Інкубацію сироваток з кон'югатом в лунках ІФА-планшета також можна проводити протягом години при температурі 37°C і постійному орбітальному перемішуванні вмісту лунок із швидкістю 300 об/хв. Однак, при цьому змінюється межа чутливості аналізу (див. п.2 Діагностичні характеристики тесту):

9.8. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки шість разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;

- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;

- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;

- повторити процедуру промивання ще п'ять разів;

- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.9. «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником, обережно відбирати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, вносити по 100 мкл розчину ТМБ в лунки

9.10. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25°C.

9.11. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ-субстрату.

9.12. Виміряти на рідері оптичну густину в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

10. Облік результатів та їх інтерпретація

10.1. Достовірність результатів аналізу:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$ОГ K_{-cp} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3})/3$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

– оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 1,2 оптичних одиниць (ОО),

– ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,1 ОО.

– оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$ОГ K_{-cp} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{-cp} \times 2,0$$

Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення К- за рештою значень негативного контролю.

10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати, додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,070, тобто

$$\text{Критичне значення} = \text{ОГ К-}_{\text{середнє}} + 0,07$$

10.3. Інтерпретація результатів.

Зразки із значенням оптичної густини нижче граничного значення вважаються **негативними** в тест-системі «HBsAg-скрин-БЕСТ». Однак результати в межах 10% нижче граничного значення слід інтерпретувати з обережністю (рекомендується повторно дослідити такі сироватки в двох лунках тест-системи).

Зразки із значенням ОГ вище граничного значення вважаються первинно позитивними. Такі зразки мають бути досліджені повторно в двох лунках тест-системи «HBsAg-скрин-БЕСТ». Після повторного тестування **позитивними** в тест-системі «HBsAg-скрин-БЕСТ» вважаються зразки, ОГ котрих хоча б в одному з повторів була вище або дорівнювала граничному значенню. Якщо при повторному тестуванні ОГ зразка в обох повторах була нижче граничного значення таку сироватку вважати негативною.

Всі позитивні при обстеженні зразки повинні бути досліджені за допомогою підтверджує тесту (рекомендується використання комплекту «HBsAg-скрин-БЕСТ-підтверджуючий»).

КОРОТКА СХЕМА ПОСТАНОВКИ «HBsAg-скрин-БЕСТ»

Використовувати тільки після ретельного ознайомлення з інструкцією!

Витримати	реагенти 30 хв. при 18-25°C	
Приготувати	розчин для промивання планшету, розвести 20х концентрат розчину для промивання Tw20 очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води	
Заповнити	бланк внесення проб для аналізу	
Розвести	концентрат кон'югату (11×) (<i>синій</i>) розчином для розведення кон'югату (<i>рожевий</i>) 1:11 (тобто, 1+10). Наприклад, 50 мкл кон'югату + 500 мкл розчину. (<i>розчин забарвлюється у фіолетовий колір</i>)	
Внести	по 100 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки: A1 – позитивний контроль, B1, C1, D1 – негативний контроль, E1 та решта лунок – досліджувані зразки. Поверх контролів та досліджуваних зразків обережно внести в лунки по 50 мкл розчину кон'югату	
Інкубація	Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 120 хв. при 42°C	
Промити	Лунки 6 разів	
Внести	В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату	
Інкубація	планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі (18-25°C)	
Внести	В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту	
Виміряти	оптичну густину в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм	
Розрахувати	граничне значення (ГЗ) в тест-системі «HBsAg-скрин-БЕСТ» за формулою $GZ = \text{ОГ К-}_{\text{середнє}} + 0,070$	
Провести облік результатів	Значення оптичної густини	Результат
	ОГ зразка > ГЗ	позитивний
	ОГ зразка < ГЗ	негативний

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ

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

Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертається 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.